DIE KONSTITUTION DES MANUMYCINS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Karsten Schröder
aus Graz

Göttingen 1974

DIE KONSTITUTION DES MANUMYCINS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Karsten Schröder
aus Graz

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent : Prof. Dr. Dr. e. h. Hans Brockmann

Korreferent : Prof. Dr. Wolfgang Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung : 2. Mai 1974

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Mai 1971 bis Oktober 1973 unter der Leitung von Herrn Dr. Axel Zeeck durchgeführt.

Herrn Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Aufgabenstellung, seine engagierte Teilnahme am Fortgang der Arbeit und viele wertvolle Dikussionen und Hinweise.

Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann bin ich wegen großzügiger finanzieller Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0003

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Theoretischer Teil	
1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2.	Isolierung des Manumycins	4
3.	Charakterisierung des Manumycins	6
	a) Chemische Eigenschaften	6
	b) Biologische Aktivität	7
	c) Spektroskopische Eigenschaften	8
	α) Massenspektrum	8
	ß) Infrarot-Spektrum	9
	γ) UV- und CD-Spektren	10
	δ) ^{1}H-NMR-Spektrum	12
	ε) ^{13}C-NMR-Spektrum	14
4.	Hydro-manumycin	17
5.	Methanolyse von Hydro-manumycin	22
	a) C_{26}-Methylester	23
	b) C_5-Aminkomponente	27
6.	Acetolyse des Manumycins	28

Seite

7. Oxidation von Hydro-manumycin 32

a) Methylester 33

b) 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid 37

8. Chromsäure-Oxidation des Manumycins 41

a) Problemstellung 41

b) C_{19}-Abbauprodukt 43

c) Seitenkette 47

d) Die Struktur des C_6-Restes 51

α) C_{19}-Abbauchinon 52

ß) C_{19}-Abbau-Hydroxy-chinon 57

γ) Folgerungen aus den Strukturen der C_{19}-Abbauchinone 65

e) Verlauf der Hydrierung des C_{19}-Abbauproduktes 69

9. Die Konstitution von Manumycin 71

10. Zur Konstitution des Hydro-manumycins 81

11. Vergleich der Konstitution des Manumycins mit anderen Naturstoffen 85

12. Zusammenfassung der Ergebnisse 89

Beschreibung der Versuche 91

Literaturverzeichnis 118

1. Einleitung

Unter Antibiotica versteht man nicht nur die relativ wenigen klinisch anwendbaren Substanzen, sondern alle Stoffe biologischen Ursprungs, die in geringer Konzentration Wachstumsvorgänge bei Microorganismen hemmen [1]. Dabei läßt sich bei näherer Untersuchung der Ort der Wirkung meist auf einen – oder wenige – für den Microorganismus lebenswichtigen Schritt festlegen [2, 3, 4]. Oft jedoch ist die gleiche Wirkung auch bei Zellen höherer Organismen gegeben, so daß viele Antibiotica für eine klinische Anwendung zu toxisch sind. Von über 2000 beschriebenen Antibiotica werden noch nicht einmal 100 in der Chemotherapie eingesetzt [5, 6].

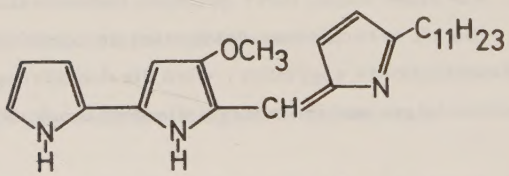
Antibiotica sind außerdem ein wichtiges Hilfsmittel in der Biochemie. Dadurch, daß ganz bestimmte Reaktionsschritte im Stoffwechsel der Zelle blockiert werden können, lassen sich Informationen über Stoffwechselzwischenprodukte gewinnen bzw. Zwischenprodukte werden in großer Menge ausgeschieden und lassen sich isolieren, was sonst wegen ihrer geringen Konzentration nicht möglich wäre. Da oft verschiedene Antibiotica an verschiedenen Stellen einer Reaktionskette angreifen, wird die Aufklärung auch komplexer Synthesefolgen und ihrer Regulationsmechanismen möglich.

Für die biochemischen Arbeiten und die Aufklärung des Wirkungsmechanismus ist die Kenntnis der Konstitution des Antibioticums wichtig. Sofern genügend große Einkristalle der Substanz gewonnen werden können, wird heute vielfach die Röntgenstrukturanalyse zur Konstitutionsermittlung eingesetzt. Allerdings ist diese Methode wegen des hohen Rechenaufwandes der konventionellen chemischen Strukturaufklärung noch nicht unbedingt überlegen. Sie liefert zwar ein genaues Bild des räumlichen Aufbaus eines Moleküls, aber dieses Bild ist statisch. Andere, spektroskopische

und chemische Methoden liefern Einblicke in die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten von Substanzen, die aus der Kenntnis der Konstitution allein nicht ableitbar sind. Von Arbeiten über Antibiotica gehen viele wichtige Anregungen und Erkenntnisse für die Chemie aus, die wegen der außerordentlichen Vielfalt der von der Natur hervorgebrachten Strukturen die Beschäftigung mit ihnen für den Chemiker auch weiterhin sinnvoll erscheinen lassen.

Aus der Gegend von Manchester, England, stammt eine Bodenprobe, aus der Streptomyces parvulus WAKSMAN et GREGORY (Stamm Tü 64) isoliert wurde [7]. Dieser Stamm[x] produziert neben dem in dieser Arbeit untersuchten, blaßgelben Manumycin zwei weitere antibiotisch wirksame Substanzen :

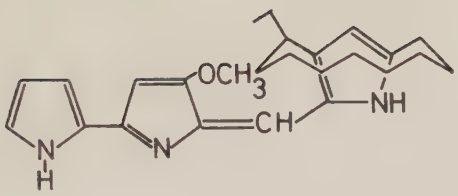
1) rote, lipophile C_{25}-Prodigiosine [8] :



Undecylprodigiosin

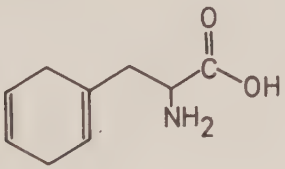
---

x) Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. H. Zähner (Institut für Microbiologie der Universität Tübingen) zur Bearbeitung überlassen.



Metacycloprodigiosin

2) farbloses hydrophiles L-2,5-Dihydro-phenylalanin [9] :



Aufgabe dieser Arbeit war es, den Stamm Tü 64 in größerem Umfang zu ziehen, eine verbesserte Methode zur Isolierung des Manumycins zu finden und die Konstitution des Manumycins, soweit möglich, aufzuklären [x].

---

x) Teile dieser Arbeit sind in einer vorläufigen Mitteilung enthalten : K. Schröder und A. Zeeck, Tetrahedron Lett. 1973 , 4995 .

2. Isolierung des Manumycins

Der Manumycin-Bildner (Stamm Tü 64) wurde in einer Nährlösung mit 2% Sojamehl und 2% Mannit im 120 l-Fermenter gezogen, bis sich das Mycel gelbrot gefärbt hatte (48-72 h). Im Plattendiffusionstest (B. subtilis auf definiertem Nährboden) gab die Kultur beim Ernten eine Hemmzone mit 32 mm Durchmesser.

Bei der ersten Isolierung des Manumycins [7] war das Antbioticum mit Äthylacetat aus dem Kulturfiltrat extrahiert und aus der organischen Phase nach Einengen mit 2 N Sodalösung ausgeschüttelt worden. Das daraus durch Ansäuern in Freiheit gesetzte Manumycin wurde mit Äthylacetat aufgenommen, nach Abdampfen des Lösungsmittels durch Craig-Verteilung (Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser 5:4:1) gereinigt und hatte nach mehrfacher Kristallisation aus Methanol/Petroläther einen Schmelzpunkt von 105°C. Wie sich herausstellte, waren die Präparate zwar weitgehend angereichert, jedoch für analytische Untersuchungen nicht ausreichend rein. Außerdem zersetzt sich das Antibioticum bei der Extraktion mit 2 N Sodalösung und nachfolgendem Ansäuern teilweise, so daß dieser Reinigungsschritt, der der Entfettung der Rohprodukte diente, unbedingt vermieden werden mußte. Die Isolierung erfolgte daraufhin wie folgt :

Das Mycel der auf pH 4-5 angesäuerten Kulturlösung wurde in einer Filterpresse abgetrennt und erschöpfend mit Aceton extrahiert. Das Kulturfiltrat war nur noch wenig aktiv und wurde verworfen. Die roten Acetonauszüge hinterließen einen öligen Verdampfungsrückstand, den man zwischen Cloroform und Wasser verteilte. Der Verdampfungsrückstand der Chloroformphase wurde beim Übergießen mit Petroläther fest. Entfetten mit Petroläther im Kreisprozeß und nachfolgende Extraktion mit Äther lieferte nach

Verdampfen des Lösungsmittels ein rotes amorphes Manumycin-Rohprodukt.

Versuche, das Manumycin in einem Schritt durch Chromatographie an neutralem oder mit verschiedenen organischen Säuren imprägniertem Kieselgel zu reinigen, waren mit hohen Verlusten an Substanz verbunden, da sich das Antibioticum am Adsorbens langsam zersetzte. Eine schonende Trennung ermöglichte die Gegenstromverteilung, die zudem den Vorteil hatte, daß mit der verfügbaren Ronor-Apparatur (400 Kammern) auch größere Substanzmengen gereinigt werden konnten. Im System Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser (5 : 4 : 1) [7] verteilte man das Rohprodukt solange, bis das erste Manumycin im Eluat der Oberphase erschien. Nach Eindampfen der entsprechenden Kammerinhalte erhielt man ein gelbrotes Pulver, das zu 95% angereichert war. Die Ausbeute an Ronor-Manumycin betrug 47 mg pro Liter Kulturlösung. Als Verunreinigung ist im DC nur noch sehr wenig des roten, schneller wandernden Bakterien-Prodigiosins [8] nachzuweisen. Für Abbau- und Derivatisierungs-Versuche war dieses Präparat ausreichend rein.

Zur Gewinnung der analytischen Daten wurde das Ronor-Manumycin zunächst aus Cyclohexan umgefällt, wobei der größte Teil des Prodigiosins in der Mutterlauge verblieb. Aus mit Aktivkohle geklärten Methanollösungen kristallisierte das Antibioticum nach Zugabe des halben Volumens Wasser (blaßgelbe Sternchen). Nach zweimaliger Kristallisation waren Schmelzpunkt (139-141 °C) und Drehwert ($[\alpha]_D^{20} = -185^\circ$ in Chloroform) des Manumycins konstant.

3. Charakterisierung des Manumycins

a) Chemische Eigenschaften

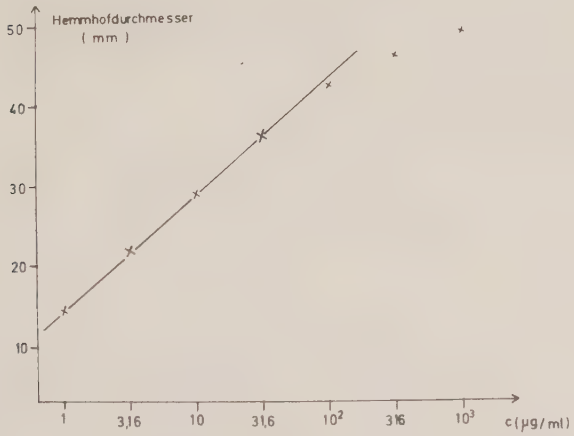
Nach milder und scharfer saurer Hydrolyse des Manumycins ließen sich nur braune Zersetzungsprodukte, aber keine Aminosäuren oder Zucker nachweisen [7]. In konz. Schwefelsäure löste es sich anfangs mit blaugrüner Farbe, die nach gelbrot umschlägt. Dies spricht für konjugierte Doppelbindungen ; erwartungsgemäß verbraucht das Manumycin bei der Hydrierung mit Palladium/Aktiv-Kohle in Methanol 7 Mol-Äquivalente Wasserstoff und entfärbt sich dabei. Die schwache Grünfärbung mit Eisen(III)-chlorid in Äthanol könnte von einer phenolischen oder enolischen Hydroxygruppe verursacht werden. In 2 N Salzsäure ist Manumycin nicht löslich, es bildet keine Salze (Pikrat, Perchlorat). Der nachgewiesene Stickstoff zeigt somit keine basischen Eigenschaften.

Das vom Verhalten in organischen Solventien her lipophile Manumycin ist eine schwache Säure und löst sich in 2 N Sodalösung bzw. Natronlauge. In der Literatur [7] wird der pK_s-Wert mit 6.5 angegeben. Potentiometrische Titration mit 0.02 N Natronlauge in 80 proz. Äthanol gibt ein Äquivalentgewicht von 550 . Es wurde später durch das Feld-Desorptions-Massenspektrum bestätigt, daß dieser Wert der Mol.-Masse entspricht. Aus den Analysenzahlen läßt sich somit die Summenformel $C_{31}H_{38}N_2O_7$ ableiten.

Derivatisierungsversuche (Methylierung, Acetylierung) führten unter verschiedenen Bedingungen nur zu komplexen, schwer trennbaren, instabilen Substanzgemischen. Die Derivatisierung der funktionellen Gruppen des Manumycins wurde daher aufgegeben zugunsten einer Strukturermittlung durch oxidativen Abbau sowohl des Antibioticums selbst als auch des stabileren Hydro-manumycins.

b) Biologische Aktivität

Manumycin hemmt das Wachstum gram-positiver Bakterien. Gegen gram-negative Keime und Pilze ist es nicht wirksam. Durch bislang nicht bekannte Substanzen aus Komplett-Nährböden wird die biologische Wirksamkeit gegen B. subtilis stark herabgesetzt. Die untere Nachweisgrenze (ca. 10 mm Hemmhofdurchmesser) liegt im Plattendiffusionstest auf definiertem Nährboden bei 1 µg/ml (Abb. 1). Die Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers vom Logarithmus der Konzentration auf definiertem Nährboden zeigt Abb. 1. Die Hemmhöfe auf Komplex-Nährboden sind jeweils nur halb so groß.



Abbild. 1: Plattendiffusionstest gegen Bacillus subtilis
(Hemmhofdurchmesser gegen den Logarithmus der Antibiotica-Konzentration aufgetragen)

c) Spektroskopische Eigenschaften

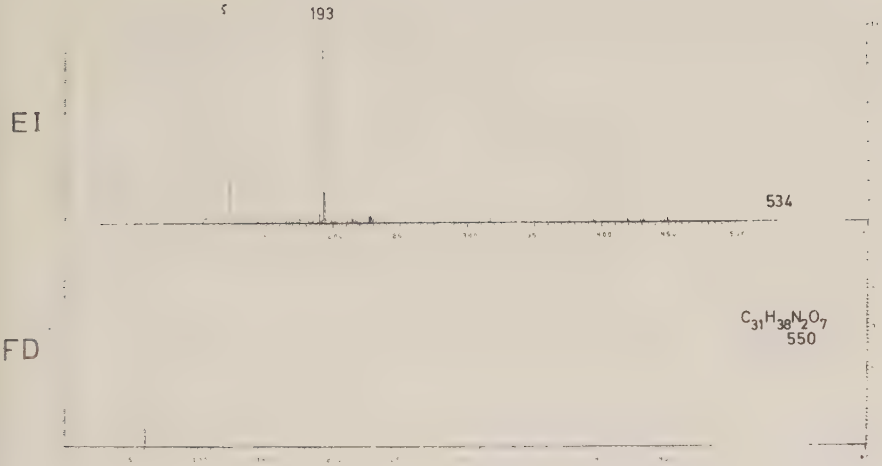
Die spektroskopischen Daten dienen an dieser Stelle zunächst der weiteren Charakterisierung des Manumycins. Einzelheiten der Struktur lassen sich aus ihnen bei einem Molekül dieser Größe nur schwer ableiten. Die eingehende Interpretation der Spektren erfolgt daher erst im Verlauf der Arbeit an den Stellen, wo einzelne Strukturelemente des Moleküls über Abbauprodukte zugänglich werden.

α) Massenspektren

Dem Elektronenstoß-Ionisations (EI)-Massenspektrum (Abb. 2) fehlt das Molekül-Ion, im unteren Massenbereich (m/e <200) sind viele Peaks mit zum Teil hoher Intensität sichtbar. Für den Basispeak m/e 193 konnte durch Hochauflösung die Summenformel $C_{13}H_{21}O$ bestimmt werden. Im Bereich m/e > 200 liefert das Spektrum keine verwertbaren Informationen; im Gegenteil, das Ion bei m/e 534 täuscht ein Molekül-Ion vor.

Das Feld-Desorptions (FD)-Massenspektrum (Abb. 2)zeigt außer dem Molekül-Ion (m/e 550) nur noch Spitzen bei m/e 532 ($M - H_2O$) und m/e 113.

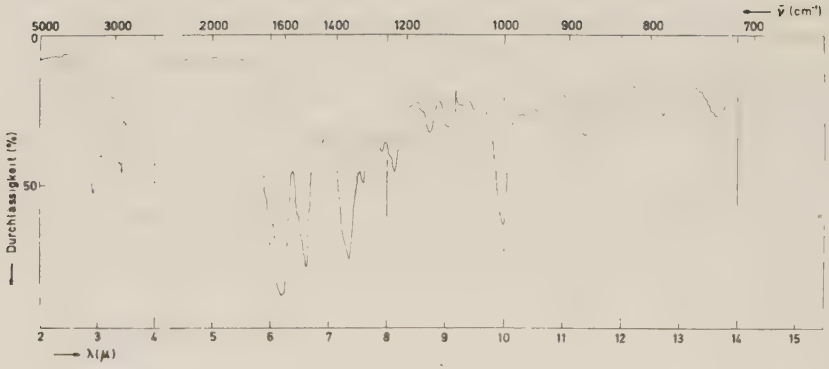
Manumycin ist nicht unzersetzt flüchtig. Das brauchen Substanzen bei der FD-Methode nicht zu sein, da hier nicht die Moleküle bei der Ionisierung in der Gasphase sein müssen, sondern ein Ion durch ein starkes elektrisches Feld gebildet und so aus der festen Phase herausgelöst wird.



Abbild. 2 : EI- (oben) und FD- (unten) Massenspektrum des Manumycins

ß) IR-Spektren

Im IR-Spektrum des Manumycins (Abb. 3) erkennt man Banden für NH- oder OH-Gruppen (3400 und 3259 cm^{-1}). Zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} ist die Absorption breit und zeigt insgesamt an, daß Carbonylgruppen und C-C-Doppelbindungen vorhanden sind. Aliphatische Ester- und Carbonyl-Gruppen fehlen im Manumycin.



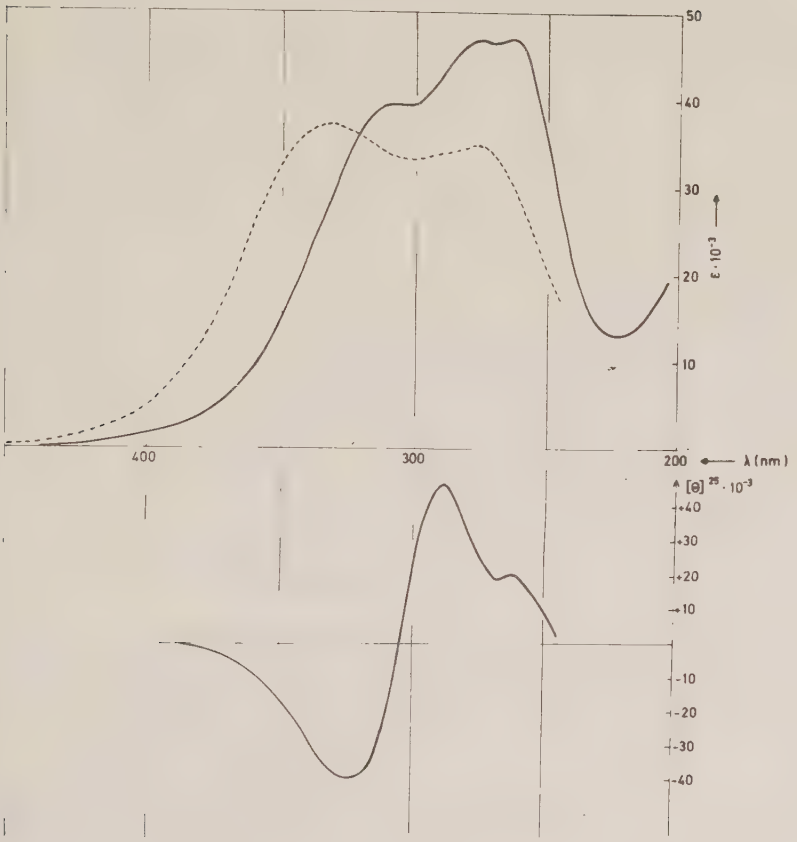
Abbild. 3 : IR-Spektrum des Manumycins in KBr

γ) UV- und CD-Spektrum

Das UV-Spektrum des Manumycins zeigt eine pH-Abhängigkeit der Extinktion und der Absorptionsmaxima (Abb. 4) . Alkali bewirkt eine Extinktionserhöhung , Säure verschiebt die Banden um ca. 15 nm bathochrom auf die Chloroformbanden, die Extinktion nimmt deutlich ab. Dies deutet darauf hin, daß eine Hydroxy-Gruppe am Chromophor in Methanol teilweise dissoziiert ist, in angesäuertem Methanol oder Chloroform jedoch undissoziiert vorliegt, so daß dieses Spektrum die Neutralform des Moleküls wiederspiegelt.

Das CD-Spektrum (Abb. 4) zeigt, wie auch der Drehwert, daß das Molekül chiral ist. Erwartungsgemäß treten ausgeprägte Cotton-Effekte bei Wellenlängen auf, die den UV-Maxima entsprechen. Für die Strukturermittlung ist dieses Spektrum ohne Wert, für die

Aufklärung der Stereochemie des Moleküls können seine Informationen jedoch Bedeutung erlangen.



Abbild. 4 : oben : UV-Spektrum des Manumycins in Methanol (——) und in Chloroform (---)

unten : CD-Spektrum des Manumycins in Chloroform

δ) ^{1}H-NMR-Spektrum

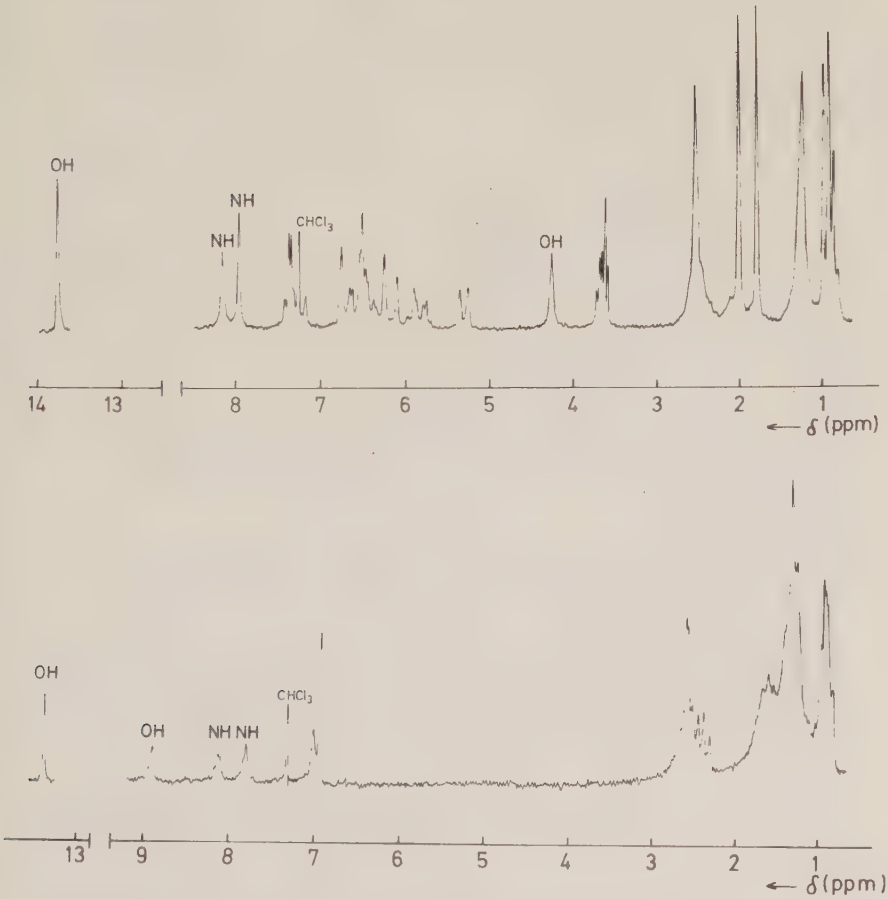
Im ^{1}H-NMR-Spektrum in $CDCl_3$ (Abb. 5) sind der Integrationskurve nach Signale für 38 Protonen erkennbar, was mit der ermittelten Summenformel übereinstimmt. Drei Signale (δ = 13.76, 8.16 und 4.28) verschwinden beim Schütteln mit D_2O und gehören demnach zu OH-oder NH-Gruppen. Im ^{1}H-NMR-Spektrum des Manumycins in d-Aceton (vgl. experimenteller Teil) liegen diese Signale bei δ = 13.77, 8.81 und 5.30. Zusätzlich zu diesen verschwindet bei Zugabe von D_2O langsam das Signal bei δ = 8.12, das dem 7.97-Signal im Chloroform-Spektrum entspricht.

Im Aliphat-Bereich (δ = 0-4 ppm) sind 4 C-Methylgruppen erkennbar, von denen zwei (δ = 0.88, t, J = 6 Hz bzw. δ = 0.98, d, J = 6 Hz) an sp^3-Kohlenstoffatomen und zwei (δ = 1.82 bzw. 2.04, Signale verbreitert) an sp^2-Kohlenstoffatomen stehen. Die schwache Verbreiterung der letztgenannten Signale schließt Acetat-Gruppen aus und deutet auf eine Allylkopplung hin. Das Signal bei δ = 1.26 (6 H) könnte von drei ähnlichen Methylen-Gruppen verursacht werden. Bei δ = 2.56 liegt ein stark verbreitertes Singulett für 5 Wasserstoffatome und um δ = 3.65 ein 2 H-Multiplett.

Im Aromat/Olefin-Bereich (5-8 ppm) finden sich Signale für zehn Wasserstoffatome mit zum Teil komplizierter Kopplung. Methoxyl-, N-Methyl- und Acetat-Gruppen sind im Manumycin nicht vorhanden, ebenso fällt die Lücke im Spektrum zwischen δ = 3 und 5 ppm auf, was bedeutet, daß nur wenige der H-Atome tragenden C-Atome Sauerstoffatomen benachbart stehen.

Durch Doppelresonanzversuche lassen sich einige der Signale im Aliphat-Bereich zuordnen, die Diskussion dieser Ergebnisse

folgt weiter unten anhand des Spektrums eines dieselben Signale enthaltenden Abbauproduktes (Kap. 8).



Abbild. 5 : ^{1}H-NMR-Spektrum des Manumycins (oben) Hydro-manumycins (unten) in $CDCl_3$

ε) ^{13}C-NMR-Spektrum

Die Meßtechnik und die Fourier-Transform-Analyse sind jetzt soweit verfeinert, daß routinemäßige Aufnahmen von ^{13}C-NMR-Spektren möglich sind. Diese sind zur Konstitutionsermittlung besonders wertvoll, da sie wesentliche Informationen über die Kohlenstoffatome liefern :

1) Die Zahl und die Umgebung der Kohlenstoffatome (breitband-rauschentkoppeltes Spektrum)

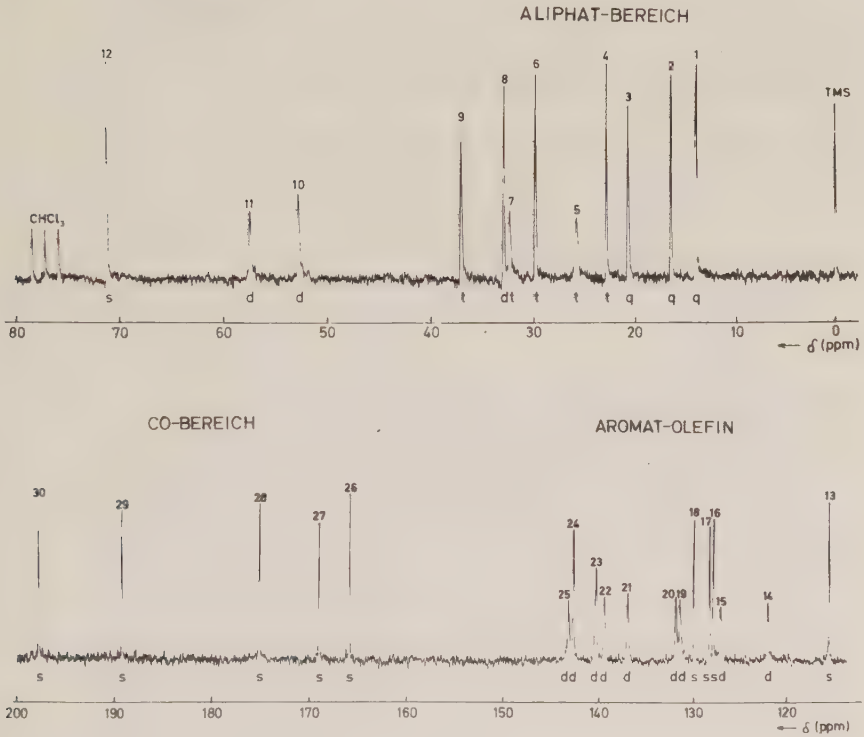
2) Die Zahl der an jedes Kohlenstoffatom gebundenen Wasserstoffatome ("off resonance"-teilentkoppeltes Spektrum)

Ganz ohne Entkopplung werden die Spektren durch Fernkopplungen und die größeren Kopplungskonstanten (J = 120 - 190 Hz) sehr komplex, so daß sich bei größeren Molekülen bei der Zuordnung Schwierigkeiten ergeben. Außerdem wird das Signal/Rausch-Verhältnis dann sehr ungünstig.

Abb. 6 zeigt das breitband-rauschentkoppelte ^{13}C-PFT-NMR-Spektrum des Manumycins. Die Multiplizität der Signale, die sich bei der "off resonance"-Teilentkopplung ergibt, steht jeweils mit kleinen Buchstaben unter den Signalen, so daß für jedes C-Atom die Zahl der anhängenden H-Atome feststeht. Überraschenderweise zeigt das Spektrum nur 30 Signale. Aus der vom Rechner ausgedruckten Peakfläche folgt jedoch, daß das Signal Nr. 1 für zwei C-Atome steht, die zufällig die gleiche chemische Verschiebung haben.

Im Aliphat-Bereich (0 - 80 ppm, Signale Nr. 1-12) erkennt man Signale für vier CH_3-Gruppen (Signale Nr. 1, 2 und 3), fünf CH_2-Gruppen (Signale Nr. 4, 6 und 9 sowie 5 und 7), eine CH-Gruppe

(Signal Nr. 8), zwei O-CH-Gruppen (Signal Nr. 10 und 11) und ein an Sauerstoff gebundenes quartäres C-Atom (Signal Nr. 12).



Abbild. 6 : ^{13}C-NMR-Spektrum des Manumycins in $CDCl_3$
oben : Aliphat-Bereich (δ = 0-80 ppm)
unten : Aromat/Olefin- und Carbonyl-Bereich (δ = 110-200 ppm)

Im Aromat/Olefin Bereich (110-150 ppm, Signale Nr. 13-25) geben sich neun tertiäre und vier quartäre C-Atome zu erkennen.

Zwei der fünf Signale im Carbonyl-Bereich (160-200 ppm) können von Ester- oder Amid-CO-Gruppen stammen , rein aliphatische Ketogruppen sind offenbar nicht enthalten.

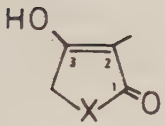
Die Zahl der Aromat/Olefin-C-Atome des Moleküls sollte gerade sein. Da nur 13 Signale im erwarteten Bereich liegen, andererseits die Gesamtzahl der Signale mit der Summenformel übereinstimmt, gibt es zwei Deutungen dieser Diskrepanz :

1) Ein Signal im Aromat/Olefin-Bereich gehört zu einer anderen Gruppierung, z. B. Nitril, Isocyanat, Oxim oder Isonitril. Nitril und Isocyanat werden durch das IR-Spektrum ausgeschlossen, denn zwischen 2300 und 2100 cm^{-1} ist keine Bande zu erkennen. Oxime und Isonitrile müßten Signale zwischen δ = 150 und 160 ergeben [10], wo dem Manumycin Spektrum jedoch Signale fehlen.

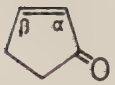
2) Ein Signal im Carbonyl-Bereich stammt von einem Olefin-C-Atom. Derartige Verschiebungen sind für C-Atome in stark polarisierten Doppelbindungen beschrieben worden. In Tetram- und Tetron-säure-Derivaten (1a/b) liegt z. B. das Signal für C-3 bei δ = 175 [11,12], das Signal des ß-C-Atoms im Δ^2-Cyclopentenon (2) bei δ = 169 [13]. Nimmt man eine derartige Verschiebung für ein Manumycin-C-Atom an, dann enthält das Molekül 4 Carbonyl-Gruppen, 14 Aromat/Olefin- und 13 Aliphat-C-Atome.

Der Summenformel nach sind im Manumycin 14 Doppelbindungsäquivalente unterzubringen. Vier davon entfallen auf Carbonylgruppen und sieben auf Vinyl-Gruppen, somit läßt sich aus dieser ersten Analyse des ^{13}C-NMR-Spektrums ableiten, daß das Molekül

drei Ringe enthalten muß.



1a X = NH Tetramsäure
1b X = O Tetronsäure



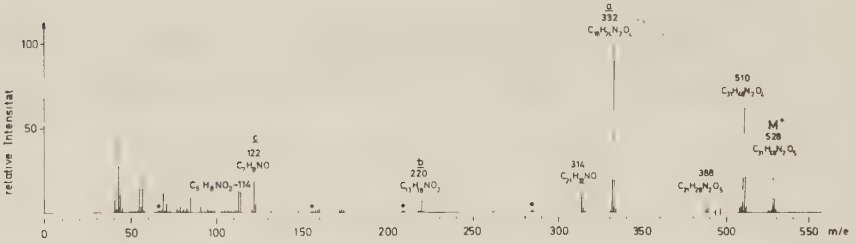
2

4. Hydro-manumycin

Bei der katalytischen Hydrierung nimmt Manumycin innerhalb von 13 min 7 Mol-Äquivalénte Wasserstoff auf. Man erhält ein farbloses Öl, aus dem durch Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform/ 2% Methanol in 39% Ausbeute farbloses Hydro-manumycin abgetrennt wurde. Im Chromatogramm langsamer wandernde Substanzen waren nicht einheitlich, ihre Untersuchung ist Gegenstand einer anderen Arbeit [14], zumal auffiel, daß die Zusammensetzung des Hydrierungsgemisches bei einzelnen Ansätzen schwankte. Die für die Konstitutionsermittlung des Manumycins wichtigen Informationen wurden mit dem Hydro-manumycin gewonnen.

Im Gegensatz zum Manumycin ist das Hydro-manumycin im Massenspektrometer unzersetzt flüchtig (Abb. 7). Für sein Molekülion bei m/e 528 wurde durch Hochauflösung die Summenformel $C_{31}H_{48}N_2O_5$ bestimmt. Die Summenformel wird ver-

ständlich, wenn Manumycin bei der Hydrierung 7 H_2 aufnimmt und anschließend zweimal Wasser abspaltet.



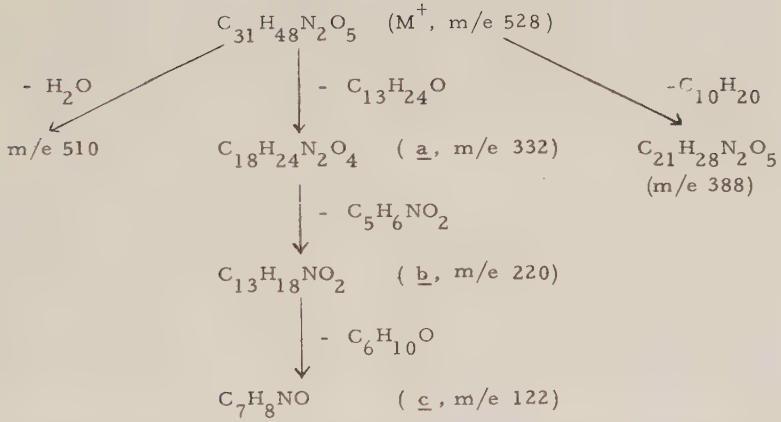
Abbild. 7 : Massenspektrum des Hydromanumycins (43a)

Für die mit großer Häufigkeit gebildeten Fragmente (Abb. 7) ergibt sich folgende Deutung :

1) Das Ion bei m/e 510 entsteht aus dem Molekül-Ion durch Wasserabspaltung, das Ion bei m/e 388 ($C_{21}H_{28}N_2O_5$) durch Verlust eines Restes $C_{10}H_{20}$.

2) Die Fragmente a , b und c lassen sich, gestützt durch die metastabilen Peaks bei m/e 209, 145.8 und 67.4, in eine Reaktionskette einordnen (vgl. Abb. 8). Vom Molekül-Ion brechen nacheinander $C_{13}H_{24}O$, $C_5H_6NO_2$ und $C_6H_{10}O$ ab. Die Spaltungen auf dem Weg zum Endprodukt c erfolgen z. T. unter Wasserstoffverschiebung .

Das indirekt nachgewiesene Fragment $C_5H_6NO_2$ tritt auch als Ion in Erscheinung, besitzt dann jedoch zwei H-Atome mehr (m/e 114).



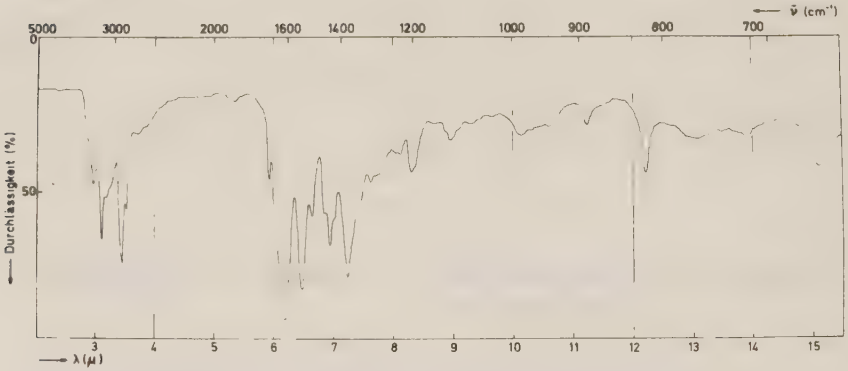
Abbild. 8 : Fragmentierungsschema des Hydro-manumycins (43a) im Massenspektrometer

3) Für das Ion m/e 314 ($C_{21}H_{32}NO$) konnte noch keine plausible Erklärung gefunden werden, die Ionen im Massenbereich unter 100 sind bei einem Molekül dieser Größe nicht sehr signifikant.

Es fällt auf, daß einige Bindungen im Hydro-manumycin im Massenspektrometer bevorzugt fragmentieren. Die so erhaltenen Schlüsselbruchstücke geben einen ersten Eindruck von den Strukturelementen, aus denen sich das Molekül aufbaut. Ziel des geplanten chemischen Abbaus sollte es sein, zu Abbauprodukten zu kommen, die den im Massenspektrum nachgewiesenen ionisierten bzw. nicht ionisierten Bruchstücken entsprechen.

Das IR-Spektrum des Hydro-manumycins (Abb. 9) ist wesentlich bandenärmer als das des Manumycins (Abb. 3). Es werden OH- bzw. NH-Gruppen (3367, 3215 und 3145 cm^{-1}) und aliphatische CH (2950-2850 cm^{-1}) angezeigt. Im Carbonylbereich liegt oberhalb 1700 cm^{-1} keine Absorption, die Banden bei 1689, 1653, 1618

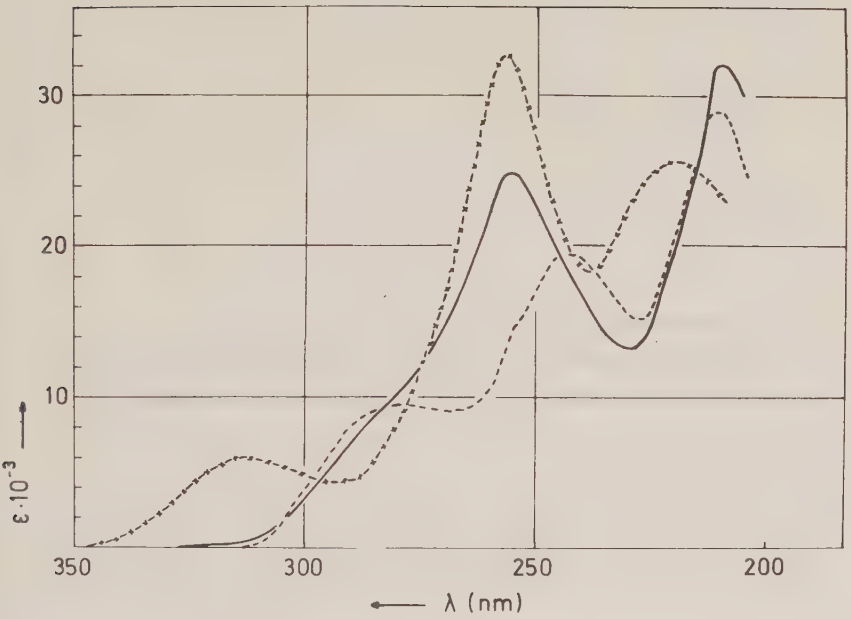
und 1600 cm^{-1} sind ähnlich wie im Manumycin. Es fehlt eine Bande, die im Manumycin um 1000 cm^{-1} liegt, neu ist im Fingerprint-Bereich eine starke Bande bei 819 cm^{-1}, die auf einen para-disubstituierten Aromaten (zwei benachbarte Wasserstoffatome) passen könnte.



Abbild. 9 : IR-Spektrum des Hydro-manumycins (43a) in KBr

Die Absorptionsmaxima im UV-Spektrum des Hydro-manumycins in Methanol (Abb. 10) liegen erwartungsgemäß kurzwelliger als im Manumycin. Das Hauptmaximum liegt bei 256 nm. Bei Zugabe von Lauge ändert es seine Lage nicht, die Extinktion nimmt jedoch stark zu. Bei Säurezusatz wird es unter Abnahme der Extinktion auf 243 nm verschoben. In alkalischer Lösung taucht zusätzlich ein Maximum bei 313 nm auf, während in saurer Lösung ein Maximum bei 278 nm sichtbar wird, das in neutraler Lösung von der Hauptbande verdeckt war (Schulter im Methanol-Spektrum). Es scheinen also mehrere, voneinander unabhängige Chromophore vor-

handen zu sein, die auf Änderungen des pH-Wertes verschieden reagieren.



Abbild. 10 : UV-Spektrum des Hydro-manumycins (43a) in Methanol (——), Methanol/Salzsäure (- - -) und Methanol/Natronlauge (-x-x-)

Dem ^{1}H-NMR-Spektrum des Hydro-manumycins (Abb. 5) fehlen im Vergleich zum Manumycin Signale im Aromat/Olefin-Bereich. Übrig sind verbreiterte Signale bei δ = 6.96 (2 H) und 7.02 (1 H), deren Kopplungen nicht aufgelöst sind. Vier weitere Signale (δ = 7.82, 8.14, 8.92 und 13.39) verschwinden beim Schütteln mit D_2O. Im Aliphat-Bereich ist das breite 2.56-Singulett des Manumycin-Spektrums erhalten (δ = 2.61), in seiner Nähe liegen jetzt mehrere Signale, die eventuell ein Multiplett bilden. Ferner erkennt man Signale für Methyl-Gruppen (um δ = 0.95) und zwischen δ = 1.2 und 1.8 nicht aufgelöste Signalgruppen für verschiedene Aliphat-H.

Da einige Signale (δ = 13.39, 8.14 und 2.61) bei der Hydrierung des Manumycins nicht verändert werden, sollten die zugehörigen Gruppen zu einem Molekülteil gehören, der keine leicht hydrierbaren Doppelbindungen enthält.

Aufgrund der Reaktionsbedingungen kann man annehmen, daß zunächst alle olefinischen Doppelbindungen des Manumycins hydriert wurden. Dafür spricht die Farbaufhellung, ferner enthält das Hydro-manumycin fünf Doppelbindungsäquivalente weniger als Manumycin und gibt mit konz. Schwefelsäure keine Farbreaktion mehr. Insgesamt ist das Hydro-manumycin erheblich stabiler als das Antibioticum und scheint für Abbaureaktionen, bei denen es nicht um die Spaltung olefinischer Doppelbindungen geht, besonders geeignet.

5. Methanolyse von Hydro-manumycin

Seinem ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 6) nach enthält das Manumycin zwei Säureamid-Bindungen. Die IR-Spektren von Manumycin und Hydro-manumycin widersprechen dem nicht, und im ^{1}H-NMR-Spektrum könnten zwei der mit D_2O verschwindenden Signale (δ = 7.97

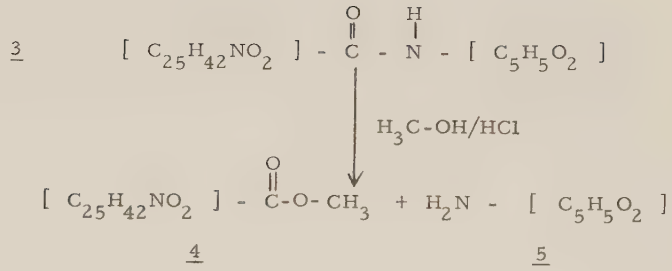
und 8.16 im Manumycin bzw. δ = 7.82 und 8.14 im Hydro-manumycin) von Säureamid-NH-Gruppen stammen. Es wurde versucht, diese Amid-Bindungen durch Methanolyse zu spalten und die entstandenen Methylester und Amine zu isolieren.

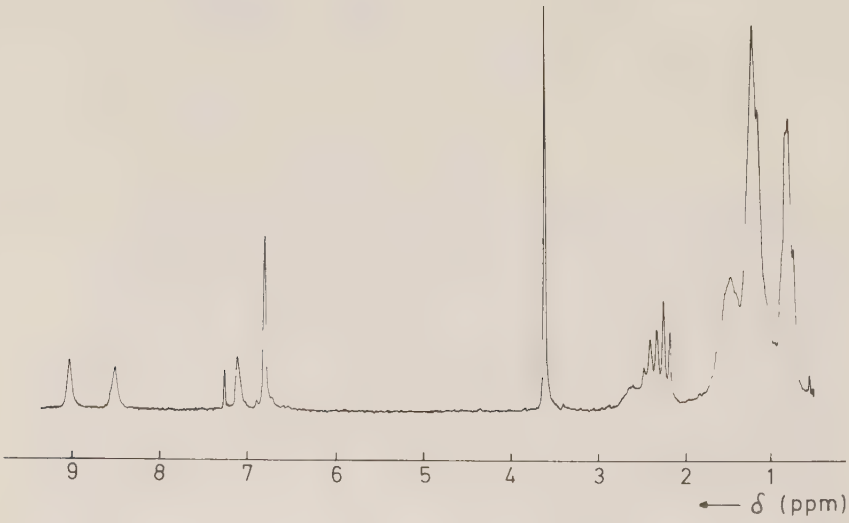
Da die Hydrolyseversuche mit Manumycin nur zu Zersetzungsprodukten geführt hatten, wurde die Methanolyse mit dem stabileren Hydro-manumycin durchgeführt. Nach 4 h bei 75°C im Bombenrohr war laut DC alles Hydro-manumycin umgewandelt. Das Reaktionsprodukt war ein gelbliches Öl mit weißlichen und bräunlichen Festsubstanzkrümeln, das sich nur teilweise in Chloroform löste. Der Rückstand war methanollöslich und wurde zunächst im Dunkeln trocken aufbewahrt.

a) C_{26}-Methylester

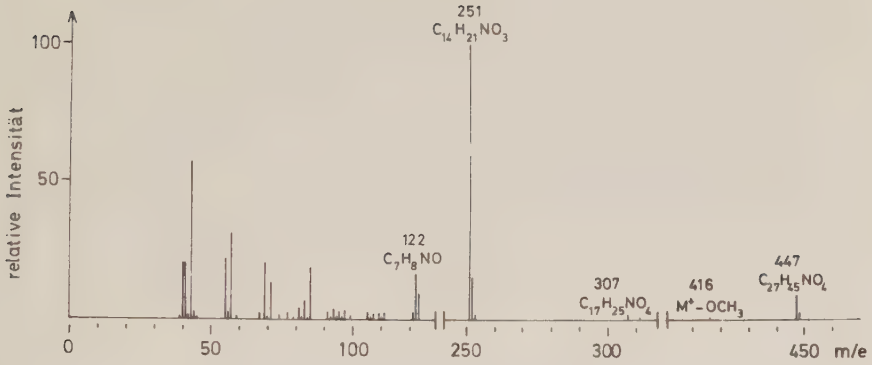
Der chloroformlösliche Teil des Methanolyseprodukts wurde an Kieselgel mit Chloroform chromatographiert und lieferte in 61% Ausbeute ein farbloses Öl, das dünnschichtchromatographisch einheitlich war.

Hochauflösende Massenspektroskopie lieferte die Summenformel $C_{27}H_{45}NO_4$ (M^+ bei m/e 447). Da das Molekül ein N-Atom weniger enthält, kann man annehmen, daß eine Amid-Bindung gespalten wurde und jetzt ein Monomethylester vorliegt. Diese Annahme bestätigt das IR-Spektrum (1739 cm^{-1}, CO-Ester), das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 11, δ = 3.65, Methoxyl-Singulett) und das Massenspektrum (Abb. 12, m/e 416 für M-OCH_3). Hydro-manumycin (3) ist also durch die Methanolyse in einen C_{26}-Methylester (4) und einen C_5-Aminteil (5) gespalten worden (vgl. Formelschema).





Abbild. 11 : ^{1}H-NMR-Spektrum des C_{26}-Methylesters (43b) in $CDCl_3$



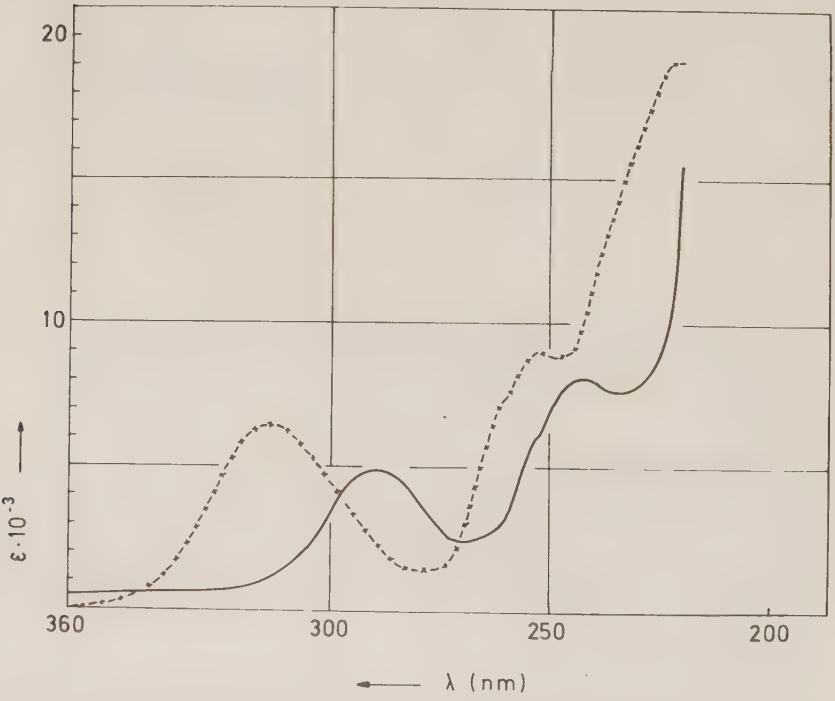
Abbild. 12 : Massenspektrum des C_{26}-Methylesters (43b) (70 eV)

Die Bande bei 1653 cm^{-1} im IR-Spektrum (Amid I) zeigt, daß die zweite Säureamid-Bindung noch intakt ist, die Bande bei 1600 cm^{-1} ist entweder Amid II oder die C=C-Valenzschwingungsbande.

Das UV-Spektrum in Methanol (Abb. 13) hat Maxima bei 289, 243 und 210 nm. Gegenüber dem Spektrum des Hydro-manumycins (Abb. 10) fehlt die Bande bei 256 nm. Natronlauge verschiebt die Banden bathochrom auf 314, 254 und 222 nm, ähnlich wie im Spektrum des Hydro-manumycins (313, [257] und 220 nm).

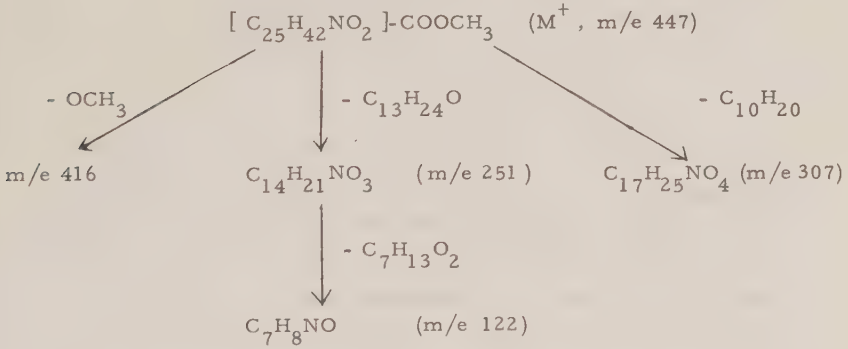
Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 11) fehlen im Vergleich zum Hydro-manumycin einige Signale, ein neues Signal bei δ = 3.65 zeigt die Methoxyl-Gruppe an. Es fehlen die Signale bei δ = 13.39 (cheliertes OH) und 7.82 (NH). Die beiden anderen mit D_2O eliminierbaren Signale liegen jetzt bei δ = 8.51 und 9.03. Es fehlt außerdem das verbreiterte Singulett bei δ = 2.61. Aus der Differenz der Integralkurven kann man entnehmen, daß dieses Signal im

Hydro-manumycin von vier Protonen verursacht wird, die wahrscheinlich zu zwei fast äquivalenten Methylen-Gruppen gehören. Die Aromat/Olefin-Signale sind, leicht verschoben, erhalten (δ = 6.83, 2 H und 7.13, 1 H). Insgesamt fehlen dem C_{26}-Methylester also Signale für sechs Protonen, die im Hydro-manumycin vorhanden waren. Dies steht mit der aus dem Massenspektrum ermittelten Summenformel in Einklang.



Abbild. 13 : UV-Spektrum des C_{26}-Methylesters (43b) in Methanol (——) und Methanol/Natronlauge (-x-x-)

Wie beim Hydro-manumycin fragmentieren einige Bindungen im C_{26}-Methylester im Massenspektrometer bevorzugt (Abb. 12 und 14). Durch Eliminierung von $C_{10}H_{20}$ entsteht das Ion m/e 307 ($C_{17}H_{25}NO_4$), m/e 416 zeigt den Verlust von Methoxyl. Abbruch von $C_{13}H_{24}O$ (unter H-Verschiebung) führt zu m/e 251 ($C_{14}H_{21}NO_3$), woraus dann weiter $C_7H_{13}O_2$ abgespalten wird (m/e 122, C_7H_8NO). Das Endprodukt dieser Reaktionskette ist dasselbe wie beim Hydro-manumycin (Abb. 7 und 8, Ion c, m/e 122).



Abbild. 14 : Fragmentierungsschema des C_{26}-Methylesters (43b) im Massenspektrometer

b) C_5-Aminkomponente

Aus dem Vergleich und der Interpretation der spektroskopischen Daten des Hydro-manumycins und des C_{26}-Methylesters ergeben sich folgende Informationen über den abgespaltenen C_5-Aminteil :

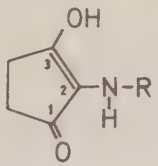
1) Aus dem Massenspektrum des Hydro-manumycins (Abb. 7) und des C_{26}-Methylesters (Abb. 12) die Summenformel ($C_5H_7NO_2$)
2) Er enthält der Summenformel nach drei Doppelbindungsäquivalente.
3) Er hat ein UV-Maximum in Methanol bei 256 nm.
4) Er enthält vier nahezu äquivalente H-Atome (benachbarte CH_2-Gruppen, die an sp^2-C-Atomen stehen, δ = 2.61 im Hydro-manumycin).
5) Er enthält eine OH-Gruppe, die im intakten Molekül cheliert ist (δ = 13.39 im Hydro-manumycin).
6) Er war als Amid an das Restmolekül gebunden (NH-CO-Gruppe im Hydro-manumycin, δ = 7.82 für Amid-NH.

Bei meinen Überlegungen, welches Strukturelement die genannten Bedingungen erfüllt, stieß ich auf das 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on (6a), das, säureamidartig gebunden, in einigen anderen mikrobiellen Stoffwechselprodukten nachgewiesen wurde, z. B. Moenomycin [15,16] und Limocrocin (7) [17]. 6a ist wenig beständig [15], somit wird verständlich, daß mir anfangs nicht gelang, die zu erwartende C_5-Aminkomponente zu isolieren. Der unlösliche Teil meines Methanolyseprodukts enthielt vermutlich das Hydrochlorid. Die Substanz verfärbte sich zunehmend dunkel und war nach einiger Zeit schon weitgehend zersetzt.

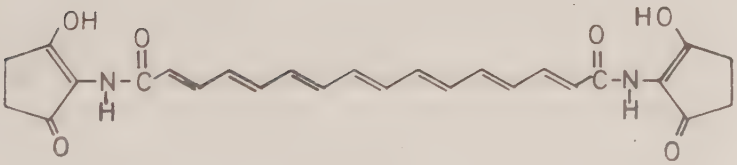
6. Acetolyse des Manumycins

In Anlehnung an die Arbeiten über das Moenomycin [15] und das Limocrocin (7) [17] versuchte ich nicht 6a, sondern sein stabiles N-Acetat 6b zu isolieren. Da der C_5-Teil im Manumycin und Hydro-manumycin, wie die ^{1}H-NMR-Spektren zeigen (vgl. Tab. 1),

gleichermaßen enthalten ist, andererseits Hydro-manumycin nur in mäßigen Ausbeuten erhalten wird, setzte ich das Manumycin direkt bei der Acetolyse (150°C, 5 h) ein. Das in Anlehnung an die Limocrocin-Arbeiten [x] isolierte Präparat (32% Aubeute) stimmte nach Hochvakuum-Sublimation in allen Daten mit einem aus Limocrocin (7) [xx] isolierten Vergleichspräparat und den Literaturangaben [15,17] überein. Damit ist die Konstitution des C_5-Molekülteils im Manumycin bewiesen.



6a : R = H
b : R = CH_3CO



7

---

x) 6b wird in diesen Arbeiten als Acetyl-limocin bezeichnet [17].

xx) Eine Probe Limocrocin wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann zur Verfügung gestellt.

Tab. 1 : ^{1}H-NMR-Signale des 2-Acetamino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-ons (6b) und die entsprechenden Signale im Spektrum des Manumycins 8a ≡ 38 und Hydro-manumycins 8b ≡ 43a (in $CDCl_3$) (δ-Werte in ppm)

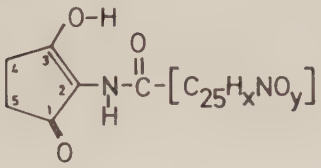
	6b	8a (≡ 38)	8b (≡43a)
3-OH	13.20	13.77	13.39
2-NH	8.22	7.97	7.82
$-CH_2-CH_2-$	2.53	2.56	2.61

Im 60 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 6b ergibt sich für die beiden Methylengruppen ein verbreitertes Singulett. Bei 100 MHz erhält man für diese bei gleicher chemischer Verschiebung (δ = 2.53) eine schwache AA'BB'-Aufspaltung [18]. Die Kopplungskonstanten sind nicht zu ermitteln, weil die Auflösung der Seitenlinien zu schlecht ist. Der Abstand der Hauptlinien beträgt ca. 3 Hz. Diese Aufspaltung zeigt, daß sich das Tautomeriegleichgewicht in Chloroform relativ langsam einstellt, was erklärlich ist, da die Wasserstoffbrücke vom 3-OH zum Carbonyl-O der Acetylgruppe geht.

Die UV-Spektren von 2-Acylamino-Derivaten des Cyclopentandions und Dimedons sind in letzter Zeit von R. Tschesche und Mitarb. [19] eingehend untersucht worden. Es zeigte sich, daß diese Substanzen in Methanol schon weitgehend dissoziieren und deshalb auf Zusatz von Alkali keine weitere bathochrome Verschiebung mehr erfolgt. Man findet aber eine starke Erhöhung der Extinktion. Nur in angesäuerter Methanollösung mißt man das Spektrum des Enols.

Mit 6b ergibt sich für Manumycin und Hydro-manumycin die Partialformel 8a bzw. 8b, in der die Amid-Carbonyl-Gruppe

bisher allerdings nur indirekt nachgewiesen ist.



8a : x = 32, y = 4
b : x = 42, y = 2

Aus dem Massenspektrum des Hydro-manumycins (Abb. 7) wird deutlich, daß die Amid-Bindung bevorzugt gespalten wird (Verlust von $C_5H_6NO_2$ aus a führt zu b). Im FD-Massenspektrum des Manumycins (Abb. 2) könnte das Ion bei m/e 113 diesen Molekülteil anzeigen (Abspaltung unter Wasserstoffverschiebung, Mol.-Masse von 6a = 113).

Der C_5-Rest in 8a erklärt auch das Signal bei δ = 175.11 (Signal Nr. 28) im ^{13}C-NMR-Spektrum des Manumycins (Abb. 6). Das Enol-C-Atom (C-3) ist besonders stark entschirmt, so daß seine Verschiebung aus dem Aromat/Olefin-Bereich heraus plausibel wird (vgl. s. o. Kap. 3c). Dann sollte das Signal bei δ = 115.39 (Signal Nr. 13) vom C-2 stammen. Die beiden Methylen-Gruppen (C-4 und C-5) geben Signale bei δ = 25.79 und 32.29 (Signal Nr. 5 und 7), die deutlich verbreitert sind. Das Signal der Carbonylgruppe (C-1) liegt bei δ = 197.79 (Signal Nr. 30). Aus später zu diskutierenden Daten folgt, daß die indirekt nachgewiesene Carbonylgruppe das Signal Nr. 27 (δ = 165.86) verursacht.

Aufgrund der NMR-Daten des Manumycins war anzunehmen, daß das Molekül zwei Amidbindungen enthält. Im bei der Methanolyse des Hydro-manumycins nachgewiesenen C_{26}-Methylester ist

die zweite Amidbindung noch intakt, daher versuchte ich zunächst, unter schärferen Bedingungen auch diese zu spalten. Bei höheren Temperaturen und längerer Reaktionszeit (105°C, 20 h) wurde der C_{26}-Methylester jedoch unverändert zurückerhalten. Daraufhin begann ich, Hydro-manumycin durch oxidativen Abbau in identifizierbare Spaltstücke zu überführen.

7. Oxidation von Hydro-manumycin

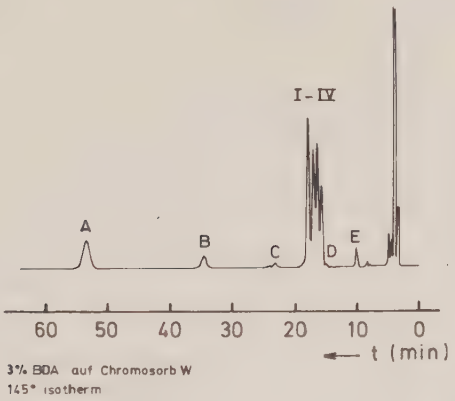
Zur Ermittlung der längsten unverzweigten aliphatischen Kette versuchte ich zunächst, mit konzentrierter Salpetersäure zu oxidieren [11]. Erwartete Mono- und Di-carbonsäuren sollten sich nach Veresterung im Gaschromatographen nachweisen lassen. Ich erhielt jedoch nur Substanzgemische, die sich im GC (6 m BDA-Säule) trotz Optimierung der Trennbedingungen nur in kleine, unsymmetrische Peaks auftrennten. Variation der Versuchsbedingungen (1-5 min, 60-130°C) erbrachte keine anderen Ergebnisse.

Deshalb probierte ich als milderes Oxidationsmittel Chrom(VI)-oxid in Eisessig mit 4.5 Mol CrO_3 pro Mol Sauerstoff im Hydro-manumycin und Zugabe des Oxidationsmittels in kleinen Portionen. In Vorversuchen erwies sich Raumtemperatur als optimal. Zur Abtrennung von basischen und Neutralstoffen von der Essigsäure und den erwarteten Abbausäuren wurde die Reaktionslösung nach Beendigung der Reaktionszeit (3,5 h) alkalisch gemacht (pH = 10) und ausgeäthert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhielt ich ein gelbliches Öl.

Aus der wäßrigen Phase wurden nach Ansäuern mit Salzsäure die Abbau-carbonsäuren mit Äther extrahiert. Diese wurden mit Diazomethan verestert und gaschromatographisch (6 m Säule mit BDA [Butandioladipat] als stationäre Phase) untersucht.

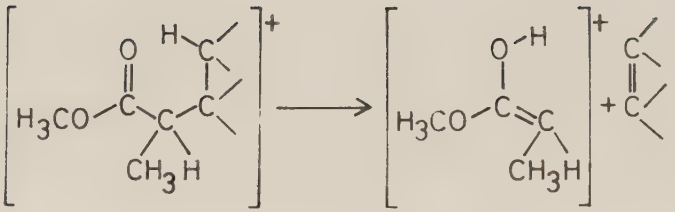
a) Methylester

Im Gaschromatogramm der Methylester (Abb. 15) erkennt man neben den Peaks A - E, die weiter unten besprochen werden, eine Gruppe von vier großen Spitzen. Die Massenspektren der zugehörigen Substanzen sind identisch, wie sich mit Hilfe der GC-MS-Kombination zeigen ließ.

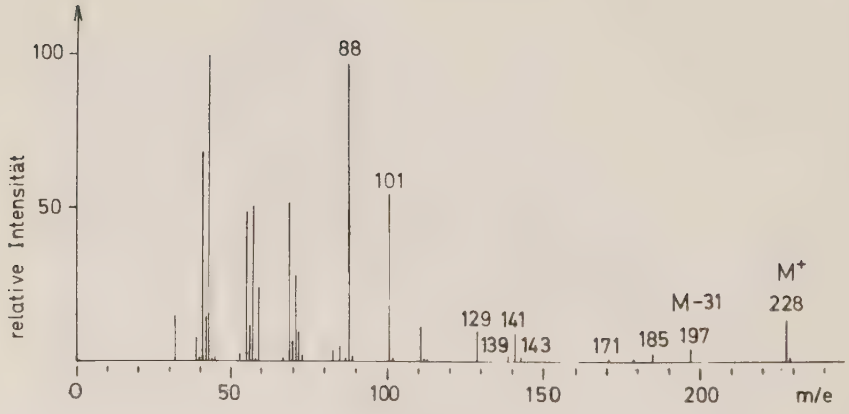


Abbild. 15 : Gaschromatogramm der Abbausäuremethylester (6 m BDA-Säule , 145°C)

Aus dem Molekülion bei m/e 228 (Abb. 16) ergibt sich die Summenformel $C_{14}H_{28}O_2$, die auf einen C_{13}-Monocarbonsäuremethylester paßt, wie der Peak bei m/e 197 ($M-OCH_3$) bestätigt. Der Basispeak bei m/e 88 entsteht durch McLafferty-Umlagerung (vgl. Formelschema) und zeigt eine α-Methylverzweigung an .



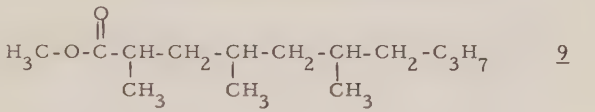
m/e 88



Abbild. 16 : Massenspektrum der diastereomeren Methylester I - IV (9)

Die anderen Peaks im Bereich m/e > 100 (Tab. 2) entstehen durch Radikalbrüche in der aliphatischen Kette. Auffallend ist, daß M - C_5H_{11} und M - C_8H_{17} in der Reihe fehlen. Das läßt sich so interpretieren, daß die Kette nicht nur in α-Stellung methylverzweigt ist. Da das Ion bei m/e 101 (M - C_9H_{19}) eine CH_2-Gruppe in ß-Stellung beweist (ß, γ-Spaltung), M - Octyl

(m/e 115) jedoch fehlt, steht am γ-C-Atom eine Methylgruppe, zumal für M-Heptyl (m/e 129) die relative Intensität 10% beträgt. Daß C-6 wieder eine Methylgruppe trägt, ergibt sich analog aus den Ionen bei m/e 143 und 174, während m/e 157 (M-Pentyl) fehlt. Ob am Kettenende eine n- oder iso-Propylgruppe steht, läßt sich mit Hilfe des Massenspektrums nicht entscheiden ; M - Äthyl fehlt bei geradkettigen Aliphaten häufig. Als Abbauprodukt des Hydro-manumycins wurde also ein n- oder iso-2,4,6-Trimethyl-decansäuremethylester (9) isoliert.



9

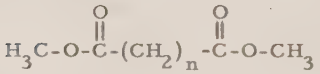
Tab. 2 : Fragmentierung des 2,4,6-Trimethyl-decansäuremethylesters (9) im Massenspektrometer (70 eV)

m/e	Summenformel	Interoretation
228	$C_{14}H_{28}O_2$	M^+
197	$C_{13}H_{25}O$	M - Methoxyl
185	$C_{11}H_{21}O_2$	M - Propyl
171	$C_{10}H_{19}O_2$	M - Butyl
143	$C_8H_{15}O_2$	M - Hexyl
129	$C_7H_{13}O_2$	M - Heptyl
101	$C_5H_9O_2$	M - Nonyl
141	$C_{10}H_{21}$	Decyl, α, ß-Spaltung
88	$C_4H_8O_2$	McLafferty-Umlagerung

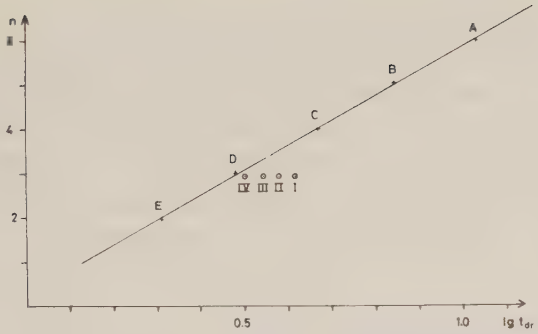
Mit 9 erfährt auch der Peak a ($M - C_{13}H_{24}O$) im Massenspektrum des Hydro-manumycins (Abb. 7) eine Erklärung : ein

C_{13}-Acylrest bricht unter Verlust des α-H-Atoms als Ketenderivat ab, d. h. Hydro-manumycin (und Manumycin) enthält eine C_{13}-Acylseitenkette im Molekül. Geht man davon aus, daß zwei der drei Chiralitätszentren in der C_{13}-Kette (C-2, C-4 und C-6) im Manumycin sp^2-hybridisiert sind und erst bei der Hydrierung entstehen, so wäre verständlich, daß 9 im Gaschromatogramm vier Peaks liefert. Die unterschiedliche Intensität der vier Peaks kann man so erklären, daß das eine native Chiralitätszentrum eine z. T. asymmetrische Hydrierung bewirkt.

Die Komponenten A - E, die das Gaschromatogramm der Methylester (Abb. 15) anzeigt, bilden eine homologe Reihe ; denn wenn man die Retentionszeit der einzelnen Komponenten (t_{dr}) logarithmisch gegen die Kettenlänge (Zahl der C-Atome) aufträgt, ergibt sich eine Gerade (Abb. 17). Die Retentionszeit von Komponente A stimmt mit der für Korksäure-dimethylester (10a , Octan-disäure-dimethylester) überein, und auch die Massenspektren der Verbindungen sind identisch [20]. Komponente B ist in Übereinstimmung mit dem Massenspektrum Pimelinsäure-dimethylester (10b) [20]. Die Komponenten C, D und E sind dann die nächsten niederen Homologen. Sie entstehen durch Weiteroxidation der primär entstandenen Korksäure am reaktionsfähigen α-C-Atom.



10a : n = 6 Korksäure-dimethylester
b : n = 5 Pimelinsäure-dimethylester
c : n = 2 Bernsteinsäure-dimethylester



Abbild. 17: Vergleich der Logarithmen der Retentionszeiten ($lg\ t_{dr}$) mit der Zahl der CH_2-Gruppen (n) der Abbau-dicarbonsäure-dimethylester A - E

Auffallend hoch ist der Peak E (Bernsteinsäure-dimethylester). Wäre er nur durch Weiteroxidation aus Korksäure entstanden, so müßte er kleiner sein als Peak D. Wahrscheinlich entsteht ein Teil der Bernsteinsäure durch Oxidation des C_5-Teils (6a) im Hydro-manumycin.

Die geradkettigen Dicarbonsäuren können nicht aus der C_{13}-Seitenkette stammen. Sie zeigen an, daß das Hydro-manumycin eine unverzweigte, gesättigte Kette mit sechs C-Atomen enthält, die an zwei weitere C-Atome gebunden ist.

b) 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid (11)

Der Verdampfungsrückstand des Ätherextraktes der schwach alkalischen Oxidationslösung wurde direkt gaschromatographisch untersucht (BDA als stationäre Phase). Das Gaschromatogramm zeigt im wesentlichen nur vier hohe Spitzen ähnlicher Retentions-

zeit, die mehr als 95% der Peakflächen ausmachen.

Die Massenspektren der vier Substanzen sind identisch (Abb. 18). Es ist also zu vermuten, daß wie bei 9 Diastereomere vorliegen. Das Molekül-Ion hat die Massenzahl m/e 213, aus der Hochauflösung ergibt sich die Summenformel $C_{13}H_{27}NO$. Danach liegt das Amid 11 der schon als Methylester nachgewiesenen 2,4,6-Trimethyl-decansäure 9 vor. Erwartungsgemäß ist 11 weniger flüchtig als 9. Die Amidgruppe wird durch das Ion m/e 73 (C_3H_7NO) bestätigt, das bei einer McLafferty-Umlagerung entsteht und zugleich die α-Methylgruppe anzeigt. Die Spitze bei m/e 86 (C_4H_8NO, M - Nonyl) entsteht durch ß,γ-Spaltung, ferner sind weitere (M-Alkyl)-Ionen sichtbar, bei denen M-Pentyl und M-Octyl wie bei 9 fehlen oder signifikant zu klein sind.

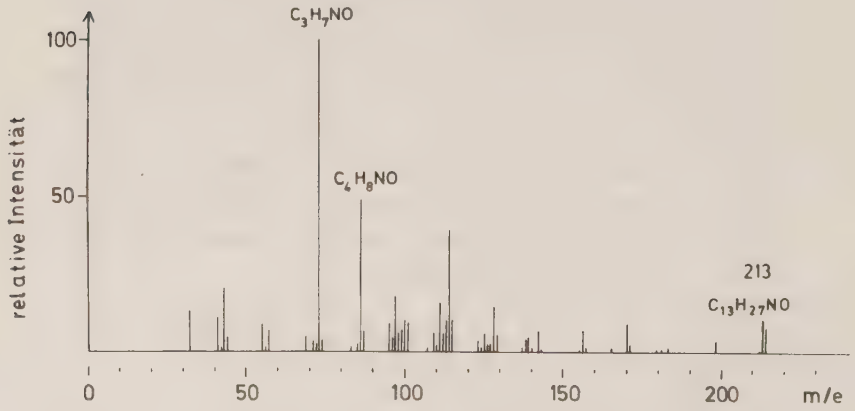
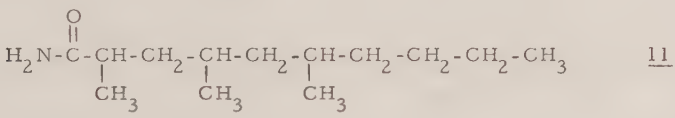


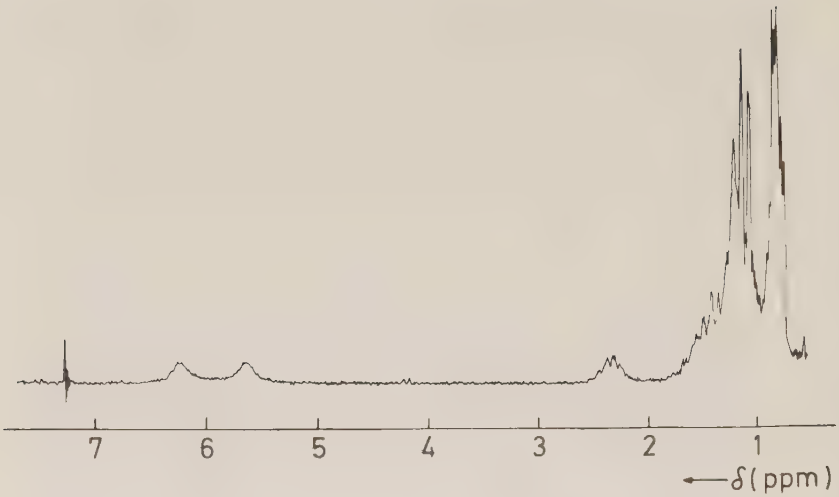
Abb. 18: Massenspektrum (70 eV) des 2,4,6-Trimethyl-decansäureamids (11)

Für die Aufnahme der weiteren Spektren wurde 11 durch Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform gereinigt. Dabei erhält man laut GC-Analyse Fraktionen, in denen die einzelnen Diastereomeren angereichert sind. Auf ihre Trennung wurde jedoch verzichtet, da sie sich in ihren spektroskopischen Daten nur geringfügig unterscheiden sollten und die Messung der Drehwerte für die Strukturaufklärung des Manumycins nichts beigetragen hätte.

Das IR-Spektrum (vgl. experimenteller Teil) bestätigt das Vorliegen eines primären Amids. Die Amid I-CO-Bande liegt bei 1650 cm^{-1}, die für Amid II tritt nur als Schulter bei 1631 cm^{-1} auf. Die Banden bei 3322 und 3155 cm^{-1} sind die NH-Valenzschwingungsbanden. Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 19) erkennt man bei δ = 0.86 ein komplexes Signal von drei Methylgruppen, das Signal der α-Methylgruppe ist bei δ = 1.14 (d, J = 7 Hz) zu sehen. Da von den vier vorhandenen Methylgruppen drei durch das Massenspektrum schon als Methylverzweigungen an C-2, C-4 und C-6 zugeordnet sind, muß also endständig eine n-Butylgruppe vorhanden sein. Das nicht aufgelöste Multiplett bei δ = 2.34 dürfte der α-CH-Gruppe zuzuordnen sein. Auffallend ist das Auftreten von zwei NH-Signalen (δ = 5.65 und 6.24, je 1 H). Dies findet man auch bei anderen primären Säureamiden wie iso-Hexansäureamid [21] und erklärt sich durch die gehinderte Rotation der NH_2-Gruppe in Säureamiden.



11



Abbild. 19 : ^{1}H-NMR-Spektrum des 2,4,6-Trimethyl-decansäureamids (11) in $CDCl_3$

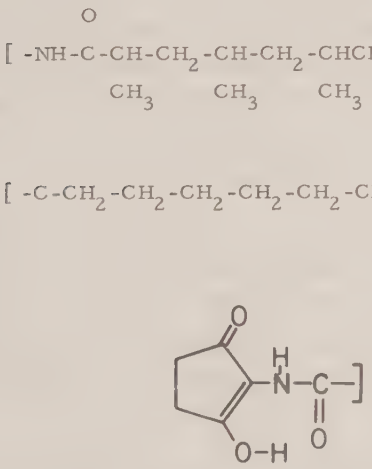
Erwartungsgemäß läßt sich 11 durch milde Methanolyse in den Methylester 9 überführen, dessen Retentionszeit und Massenspektrum mit dem direkt aus der Reaktionslösung isolierten Präparat identisch ist.

Durch 11 wird bewiesen, daß im Hydro-manumycin 2,4,6-Trimethyldecansäure als Amid gebunden ist. Dieser Befund sollte auch für das Manumycin gelten, bei dem die C_{13}-Seitenkette wegen der Diastereomeren bei 9 und 11 noch mindestens zwei Doppelbindungen enthält.

8. Chromsäure-Oxidation des Manumycins

a) Problemstellung

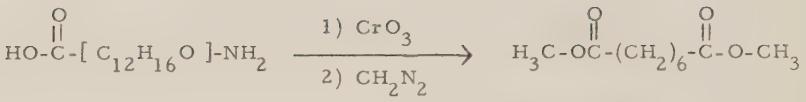
Durch Isolierung und Identifizierung des C_{13}-Säureamids 11, des Korksäure-dimethylesters (10a) und des 2-Acetamino-3-Hydroxy-2-cyclopenten-1-ons (6b) sind die Partialstrukturen 12, 13 und 14 für Hydro-manumycin bewiesen. Damit sind von 31 C-Atomen 26 in Abbauprodukten nachgewiesen. Von 12 und 14 kann angenommen werden, daß sie als Endgruppen über Säureamidbindungen an einen Mittelteil des Moleküls gebunden sind, der nach Hydrolyse der Amidbindungen die Summenformel $C_{13}H_{19}NO_3$ hätte (Aminocarbonsäure 15). Damit ergibt sich für Hydro-manumycin die Partialformel 16. Die Korksäure stammt aus dem Mittelteil 15, ob eine ihrer Carboxyl-gruppen mit dem Säureamid-CO an 14 identisch ist, bleibt zunächst offen.



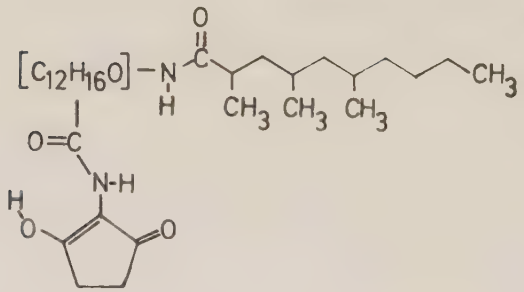
C_{13} 12

C_8 13

C_{5+1} 14



15 10a



16

Von dem C_{13}-Mittelteil des Moleküls sind noch fünf C-Atome nicht in Abbauprodukten enthalten. Außerdem fehlt im Hydro-manumycin die Zuordnung eines Sauerstoffatoms sowie die von vier Doppelbindungsäquivalenten, von denen mit Sicherheit zwei aufgrund der ^{1}H-NMR-Signale (vgl. Abb. 5) bei δ = 6.96 (2 H) und 7.02 (1 H) von Aromat/Olefin-Doppelbindungen stammen.

Vom Manumycin selbst ist erst die Partialstruktur 14 durch Abbau sicher nachgewiesen. Geht man davon aus, daß das C-Atom-Gerüst bei der Hydrierung unverändert bleibt, müssen im Manumycin noch zwei weitere Sauerstoffatome sowie noch acht Doppelbindungsäquivalente, davon zwei in der C_{13}-Seitenkette, zugeordnet werden.

Nachdem der oxidative Abbau des Hydro-manumycins gelungen war, versuchte ich als nächstes, auch das Manumycin selbst unter möglichst milden Bedingungen zu zerlegen. Die Absicht war, aus

dem C_{13}-Mittelteil des Moleküls stammende Bruchstücke zu isolieren, die die fünf noch nicht in Abbauprodukten nachgewiesenen C-Atome enthalten, so daß sich aus der Kombination mit den Ergebnissen am Hydro-manumycin Rückschlüsse auf die Struktur des Manumycins ziehen lassen. Zu erwarten war, daß bei einer milden Oxidation mit Chromsäure das Molekül vornehmlich an den olefinischen Doppelbindungen oder an C-Atomen, die OH-Gruppen tragen und damit einer Oxidation leicht zugänglich sind, gespalten wird.

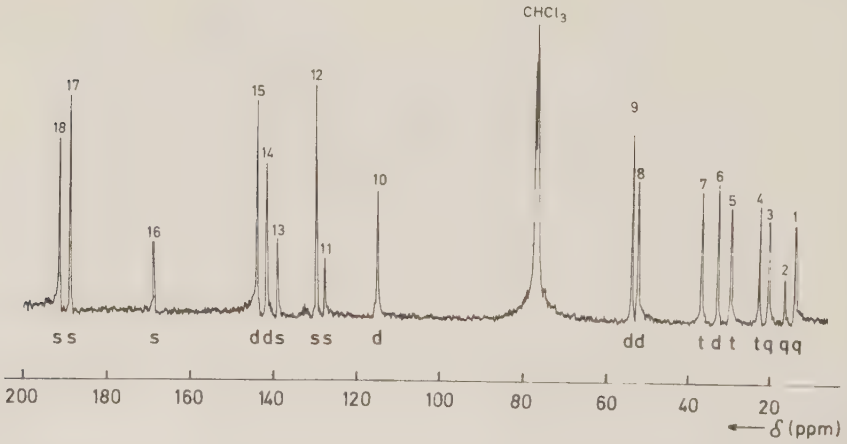
b) C_{19}-Abbauprodukt

Die Oxidation des Manumycins wurde in 75 proz. Eisessig bei Raumtemperatur mit einem 5 fachen molaren Überschuß an Chromsäure durchgeführt. Nach Ausäthern der mit Wasser verdünnten Reaktionslösung und Abdampfen des Lösungsmittels erhielt ich ein Öl, das an Kieselgel mit Chloroform/2% Methanol chromatographisch aufgetrennt wurde. Der Inhaltsstoff der ersten Zone (38% Ausbeute) war dünnschichtchromatographisch einheitlich und wanderte schneller als Manumycin, von dem unter den gewählten Reaktionsbedingungen ca. 10% unverändert zurückgewonnen wurden. Das Oxidationsprodukt ist in wäßrigen Säuren und Laugen unlöslich.

Aus dem Massenspektrum (Abb. 23), dessen Hauptpeaks hochaufgelöst wurden, ergibt sich die Summenformel $C_{19}H_{25}NO_4$ (M^+ bei m/e 331). Damit wird deutlich, daß ein Abbauprodukt des Manumycins vorliegt.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 20) zeigt 18 Signale, wobei wie beim Manumycin Signal Nr. 1 für zwei C-Atome steht, die zufällig die gleiche chemische Verschiebung haben. Im Aliphatbereich

(δ = 0 - 60) liegen Signale für 10 sp^3-C-Atome (Signale Nr. 1-9) mit ähnlicher chemischer Verschiebung wie im Manumycinspektrum (vgl. Tab. 5 auf S. 72). Zwei davon (Signale Nr. 8 und 9) sind der chemischen Verschiebung (δ = 52.58, d und 53.87, d) nach einfach an Sauerstoff gebunden. Es fehlen die verbreiterten Signale Nr. 5 und 7 des Manumycinspektrums, was beweist, daß der 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on-Teil im Abbauprodukt nicht mehr enthalten ist, und das Signal Nr. 12 (δ = 71.17). Außer diesen drei sind alle Aliphat-Signale des Manumycins im Abbauprodukt noch vorhanden.

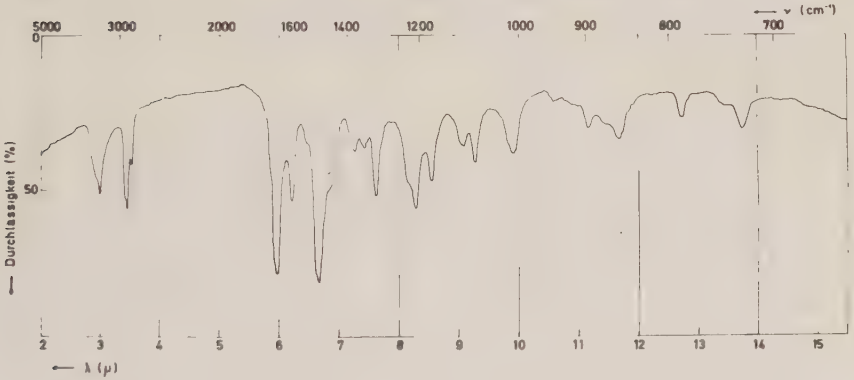


Abbild. 20 : ^{13}C-NMR-Spektrum des C_{19}-Abbauproduktes 30 in $CHCl_3$

Das N-Atom ist Teil eines Amids (Amid-CO : δ = 168.44, Signal Nr. 16). Dies sollte die Amidbindung der C_{13}-Seitenkette sein, die demnach noch intakt ist. Mit dem C_{19}-Abbauprodukt sind also die 13 C-Atome der Seitenkette und 6 C-Atome des C_{13}-

Mittelteils des Manumycins isoliert worden.

Das Abbauprodukt enthält zwei Keto-Gruppen (Signale Nr. 17 und 18) von denen eine aufgrund des Vergleichs mit dem Manumycinspektrum (Tab. 5) bei der Oxidation entstanden sein muß. Der chemischen Verschiebung der CO-Signale nach sind die Carbonylgruppen mit Doppelbindungen konjugiert. Das IR-Spektrum (Abb. 21) bestätigt diese Vermutung (IR : 1675 cm^{-1} mit Schulter bei 1684, überlagert mit Amid-CO).

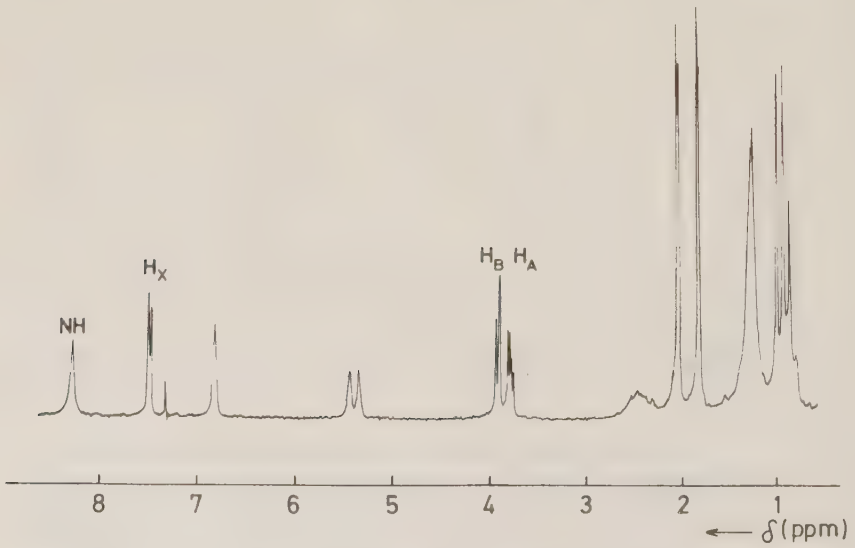


Abbild. 21 : IR-Spektrum des C_{19}-Abbauproduktes 30 in KBr

Das vierte Sauerstoffatom muß dann einfach gebunden sein. Als Nachbarn kommen die beiden den Signalen Nr. 8 und 9 zugrunde liegenden CH-Gruppen in Frage. Da die Zahl der Doppelbindungsäquivalente der Summenformel nach acht beträgt und nur drei Carbonylgruppen und drei Vinylgruppen (Signale Nr. 10-15) enthalten sind, muß der Bindungsausgleich durch zweifachen Ringschluß erfolgen.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 22) erkennt man Signale für die 25 Protonen. Auch hier decken sich die meisten Signale in che-

mischer Verschiebung und Multiplizität mit denen des Manumycins (vgl. Tab. 5 auf S. 72). Das Triplett bei δ = 0.89 (J = 6 Hz) und das Dublett bei δ = 1.00 (J = 6 Hz) zeigen Methylgruppen an einer Methylen- bzw. Methin-Gruppe an. Das breite Signal bei δ = 1.3 steht für drei Methylengruppen. Bei δ = 1.86 (d, J = 1.6 Hz) und 2.08 (d, J = 1.6 Hz) erkennt man Signale für zwei Methylgruppen an Doppelbindungen. Das breite unstrukturierte Signal bei δ = 2.48 gehört wahrscheinlcih zu einer CH-Gruppe neben einem sp^2-C-Atom. Damit sind sieben C-Atome nachgewiesen, die C-Atomen benachbart sind.



Abbild. 22 : ^{1}H-NMR-Spektrum des C_{19}-Abbauproduktes 30 in $CDCl_3$

Die Signale bei δ = 3.80, 3.94 und 7.51 (je 1 H) bilden ein ABX-System (J_{AB} = 3.5 Hz, J_{AX} = 2.5 Hz, J_{BX} = 0 Hz, vgl.

Tab. 4), wie sich durch Doppelresonanzversuche zeigen läßt. Die Signale bei $\delta = 5.41$ (verbreitertes Dublett, $J = 10$ Hz, 1 H) und $\delta = 6.83$ (verbreitertes Singulett, 1 H) werden von Olefin-H verursacht. Das verbreiterte Singulett bei $\delta = 8.31$ (1 H) nimmt nach Schütteln mit D_2O langsam in der Intensität ab (in 30 min um die Hälfte) ; es dürfte sich hier um ein NH-Proton handeln, denn ein OH-Proton sollte viel schneller austauschen.

Wenn man annimmt, daß der AB-Teil des ABX-Systems von zwei nicht äquivalenten aliphatischen CH-Gruppen verursacht wird, die einem O-Atom benachbart stehen, ergibt sich kein Widerspruch zu den aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum gewonnenen Aussagen.

c) Die Seitenkette

Im Massenspektrum des C_{19}-Abbauproduktes (Abb. 23) tritt mit relativ großer Häufigkeit das Ion m/e 193 auf, das die Summenformel $C_{13}H_{21}O$ hat und unter Verlust von CO in das Ion m/e 165 ($C_{12}H_{21}$) übergeht. Das 193-Ion tritt auch im Manumycin-Massenspektrum (Abb. 2) auf, es ist deshalb anzunehmen, daß das zugrundeliegende Strukturelement bei der Oxidation nicht verändert wurde.

Aufgrund der Anzahl der H-Atome und leichten CO-Abspaltung ist anzunehmen, daß es sich um eine aliphatische C_{13}-Acylseitenkette handelt, die zwei Doppelbindungen enthält. Damit wird dasselbe Strukturelement nachgewiesen, das bei der Oxidation des Hydro-manumycins das C_{13}-Amid 11 und den C_{13}-Carbonsäuremethylester 9 lieferte. Mit Hilfe von ^1H-Doppelresonanzversuchen am C_{19}-Abbauprodukt des Manumycins ließ sich die Struktur der zweifach ungesättigten C_{13}-Acylseitenkette aufklären. Die Ergebnisse sind hier leichter und eindeutiger zu interpretieren als

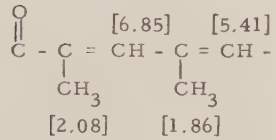
im komplizierteren Manumycinspektrum .

Tab. 3 : ^{1}H-Doppelresonanzexperimente am C_{19}-Abbauprodukt 30

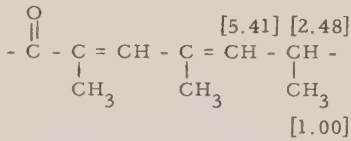
Einstrahlung	Zuordnung	entkoppeltes Signal	Vereinfachung	Zuordnung
6.85	3'-H	2.08	2 Linien in 1	11'-H (CH_3 an C-2')
5.41	5'-H	1.86	2 Linien in 1	12'-H (CH_3 an C-4')
5.41 2.08	5'-H 11'-H (CH_3 an C-2')	6.85	Verschärfung	3'-H
2.48	6'-H	5.41	2 Linien in 1	5'-H
		1.00	2 Linien in 1	13'-H (CH_3 an C-6')
7.51	3-H	3.80	4 Linien in 2 (J = 3.5 Hz)	5-H

Das CH_3-Dublett bei δ = 2.08 wird ein scharfes Singulett durch Einstrahlung bei δ = 6.85, ebenso das bei δ = 1.86 durch Einstrahlen bei δ = 5.41 . Die schwache Kopplung von 1.6 Hz und die chemische Verschiebung der Methylsignale beweisen zwei methylsubstituierte Vinylgruppen, von denen eine so angeordnet sein muß, daß die CH_3-Gruppe α-ständig zur Carbonylgruppe ist. Dies folgt aus den Massenspektren der gesättigten Abbauprodukte 9 und 11 und steht mit der chemischen Verschiebung bei δ = 6.85, die einem zur CO-Gruppe ß-ständigen Olefin-H entspricht, in Einklang. Daß die beiden Vinyl-

gruppen konjugiert sind, ergibt sich durch Dreifachresonanz, die eine sehr schwache Kopplung der beiden Vinyl-CH anzeigt, deren Größe eine Viccinalkopplung jedoch ausscheidet. Es folgt Strukturelement 17, dessen δ-Proton (δ = 5.41) mit dem

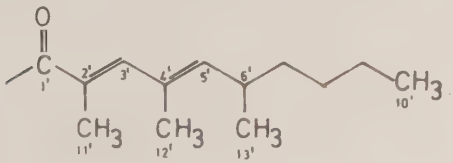


17

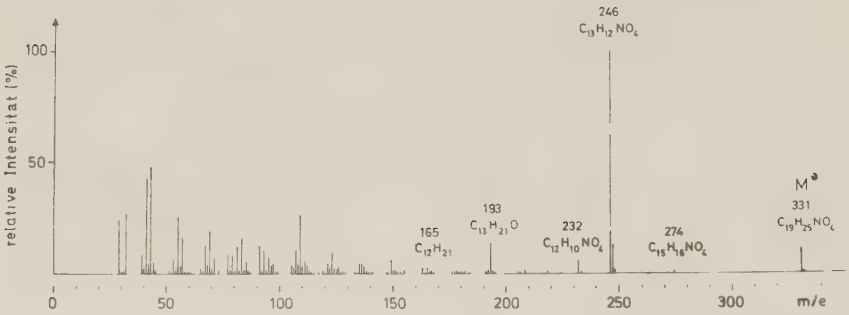


18

Proton des 1 H-Multipletts bei δ = 2.48 (J = 10 Hz) koppelt, das seinerseits das Signal der Methylgruppe bei 1.00 aufspaltet (J = 6 Hz). Damit kann man Strukturelement 17 zu 18 erweitern. Ausgehend von der durch das Massenspektrum gesicherten Summenformel der Seitenkette $C_{13}H_{21}O$ muß als Endgruppe eine Butylgruppe anschließen. Da das C_{19}-Abbauprodukt im ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum neben dem 0.89-Triplett keine weiteren Methylgruppen mehr anzeigt, und das 1.3-Signal für drei Methylengruppen vorhanden ist, handelt es sich um eine n-Butylgruppe. Das Massenspektrum (Abb. 23) bestätigt diese Ergebnisse : Das Ion m/e 274 entspricht M-C_4H_9, M-Propyl und M-Pentyl fehlen und das Ion m/e 246 (M-C_6H_{13}) bestätigt die Methylgruppe an C-6' (C-13'). Damit ergibt sich für die C_{13}-Acylseitenkette der 2,4,6-Trimethyl-2,4-decadienoyl-Rest entsprechend Partialformel 19.



19



Abbild. 23 : Massenspektrum des C_{19}-Abbauproduktes 30 (70 eV)

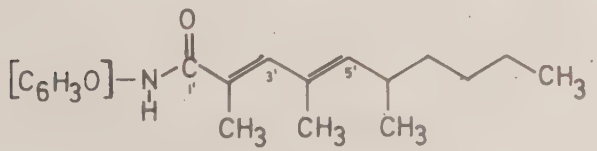
Ob die Doppelbindungen cis- oder trans-Konfiguration haben, kann anhand des ^{1}H-NMR-Spektrums nicht entschieden werden. Wegen der alternierenden Methylsubstitution bringt auch das IR-Spektrum keine Klärung. Schätzt man die sterischen Verhältnisse an einem Molekülmodell der C_{13}-Acylkette aus Stuart – Kalotten ab, so zeigt sich unabhängig von der Konfiguration der Doppelbindungen eine Behinderung der α- und γ-Methylgruppe, die zu einer Verdrehung der β,γ-Bindung führen müßte. Dann wäre die Konjugation teilweise aufgehoben, was sich auf die Signallagen der Protonen im NMR-Spektrum auswirken sollte. Tatsächlich liegt das 5.41-Signal in einem Bereich der für Protonen an einer isolierten Doppelbindung typisch ist, während das 6.85-Signal mit anderen α,β-ungesättigten Carbonsäurederivaten in Einklang steht[22]. Bis zur endgültigen Klärung gebe ich der all-trans-Form den Vorzug und formuliere die C_{13}-Seitenkette wie in 19.

Im C_{13}-Acylrest 19 ist C-6' ein Chiralitätszentrum, das als Teil eines Naturstoffes optisch einheitlich sein sollte. Das C_{19}-

Abbauprodukt ist erwartungsgemäß optisch aktiv ($[\alpha]_D^{20} = -8.1^o$), dieser Betrag stammt jedoch nicht ausschließlich von C-6'. Daß bei der Hydrierung von 19 insgesamt vier Diastereomere beobachtet werden, steht mit der Erwartung in Einklang (neue Chiralitätszentren an C-2' und C-4').

d) Die Struktur des C_6-Restes

Durch das 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid(11) aus dem Hydro-manumycin war bewiesen worden, daß die C_{13}-Acylseitenkette als Amid vorliegt. Dies sollte in gleicher Weise für die ungesättigte Seitenkette 19 gelten, so daß das ^{1}H-Signal bei $\delta = 8.31$ im C_{19}-Abbauprodukt einem Amid-NH zugeordnet werden kann. Somit ist im C_{19}-Abbauprodukt noch ein Rest $C_6H_3O_3$ (Partialformel 20) zuzuordnen. Dieser Molekülteil enthält nach dem oben gesagten zwei CH-Gruppen (an Sauerstoff gebunden), zwei Carbonylgruppen (dem ^{13}C-NMR-Spektrum nach konjugierte Keto-Carbonyle), eine C=CH-Gruppierung und ein einfach gebundenes Sauerstoffatom. Eine Hydroxyl-Gruppe kann nicht vorliegen, da alle 25 Protonen des Moleküls zugeordnet sind. Außerdem müssen den Doppelbindungsäquivalenten nach aus den verfügbaren Atomen zwei Ringe gebildet werden. Mit diesen Angaben kann die Struktur des C_6-Restes in 20 noch nicht mit Sicherheit abgeleitet werden.



20

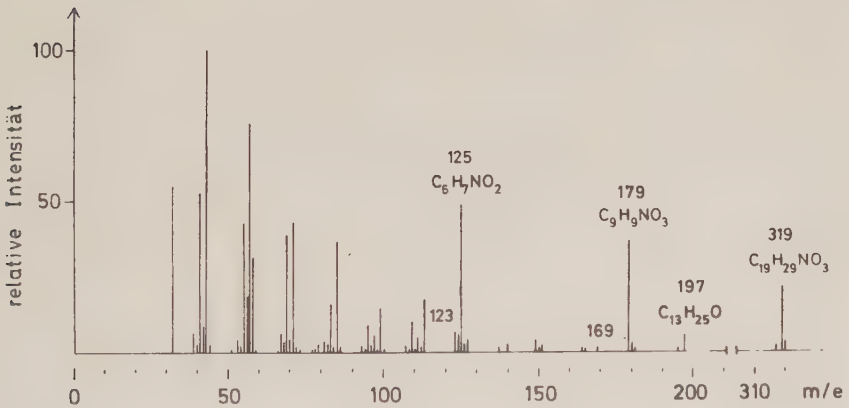
Um zunächst das C-Atomgerüst zu sichern, hydrierte ich das C_{19}-Abbauprodukt mit Palladium/Aktiv-Kohle in Methanol bis zur Beendigung der Wasseraufnahme (10 min). Chromatographie des Produktgemisches an Kieselgel mit Chloroform ergab in 12% Ausbeute ein gelbes Öl (C_{19}-Abbauchinon). Eine rote Kopfzone wurde mit Methanol eluiert und ihr Inhaltsstoff an Oxalsäure-Kieselgel nachgereinigt. Ich erhielt in 69% Ausbeute eine gelbrote Festsubstanz (C_{19}-Hydroxy-Abbauchinon).

α) C_{19}-Abbauchinon

Die gelbe Substanz gibt im Massenspektrum (Abb. 24) ein Molekül-Ion bei m/e 319 mit der Summenformel $C_{19}H_{29}NO_3$ (Hochauflösung). Vom C_{19}-Abbauprodukt $C_{19}H_{25}NO_4$ ausgehend wurden also drei Mol Wasserstoff aufgenommen und einmal Wasser abgespalten. Daß zwei Mol H_2 erwartungsgemäß von der C_{13}-Seitenkette verbraucht werden, zeigt das Ion m/e 197 ($C_{13}H_{25}O$) an, das der gesättigten Acylseitenkette entspricht. Das Ion m/e 169 entsteht durch Abspaltung von CO aus dieser Kette, das bei m/e 179 durch McLafferty-Umlagerung (α, ß-Spaltung unter H-Verschiebung), wobei das Molekül-Ion $C_{10}H_{20}$ verliert.

Man sollte erwarten, daß die C_{13}-Acylkette, wie beim Hydromanumycin, auch unter Wasserstoffverschiebung abbricht und die Ladung am C_6-Rest bleibt. Der Peak bei m/e 123 könnte dieses Ion sein, wegen seiner geringen Intensität konnte er jedoch nicht hochaufgelöst werden. Mit wesentlich größerer Intensität tritt dagegen m/e 125 ($C_6H_7NO_2$) auf, d.h. der C_6-Rest hat noch zwei H-Atome zusätzlich aufgenommen. Solche Wasserstoffaufnahmen im Massenspektrometer findet man allgemein bei

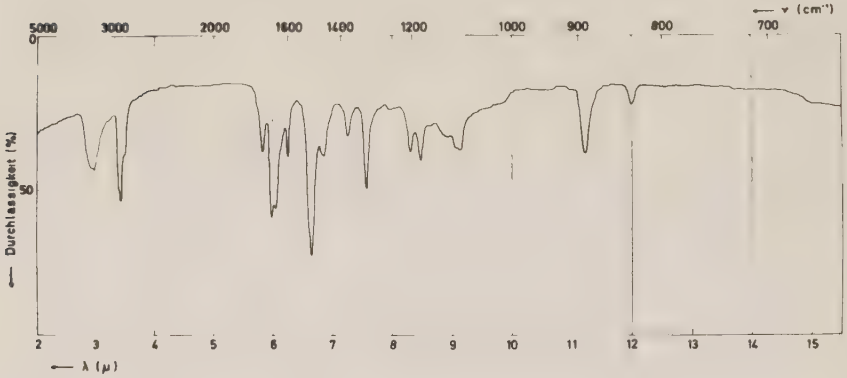
Chinonen mit größeren Alkylsubstituenten (vgl. Ubichinon und Plastochinon [23]). Die Peaks im unteren Massenbereich konnten nicht hochaufgelöst werden, so daß nicht entschieden werden kann ob z. B. die Ionen m/e 95 und 67 dem Verlust von einem oder zwei Carbonyl entsprechen, was ein weiterer wichtiger Hinweis auf ein Chinon wäre [24].



Abbild. 24 : Massenspektrum des Abbauchinons 21

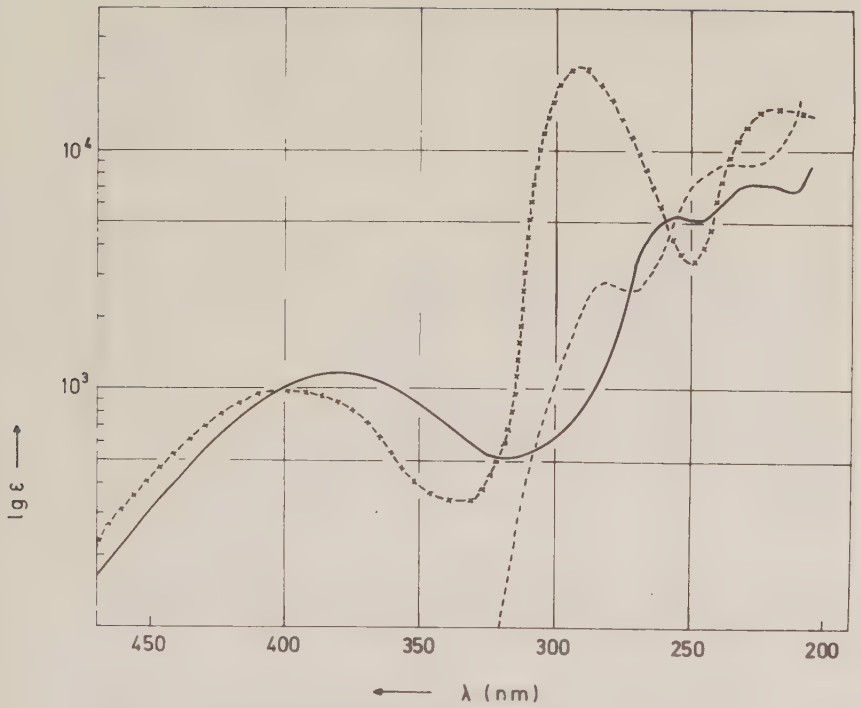
Im IR-Spektrum (Abb. 25) erkennt man Banden für Carbonylgruppen bei 1672 und 1653 cm^{-1}, von denen eine der Amid-CO-Valenzschwingung (Amid I) entspricht. Zusammen mit der Bande bei 1600 cm^{-1} (C=C-Valenzschwingung) weist die andere auf ein Chinon hin (1,4-Benzochinon : 1669, 1653 und um 1600 cm^{-1} [25]). Prinzipiell könnte man die 1600 cm^{-1}-Schwingung zusammen mit den Banden bei 1504, 892 und 834 cm^{-1}, auch als Aromat-Schwingung deuten, allerdings passen die angeführten Banden im Fingerprint-Bereich genausogut auch auf ein Chinon [25].

Die Bande bei 3356 cm^{-1} wird von einer NH-Gruppe verursacht, die Bande bei 1718 cm^{-1} könnte auch von einer Verunreinigung stammen. Das UV-Spektrum (Abb. 26) spricht gegen einen Aromaten und für ein Chinon als Chromophor.



Abbild. 25 : IR-Spektrum des Abbauchinons 21 in KBr

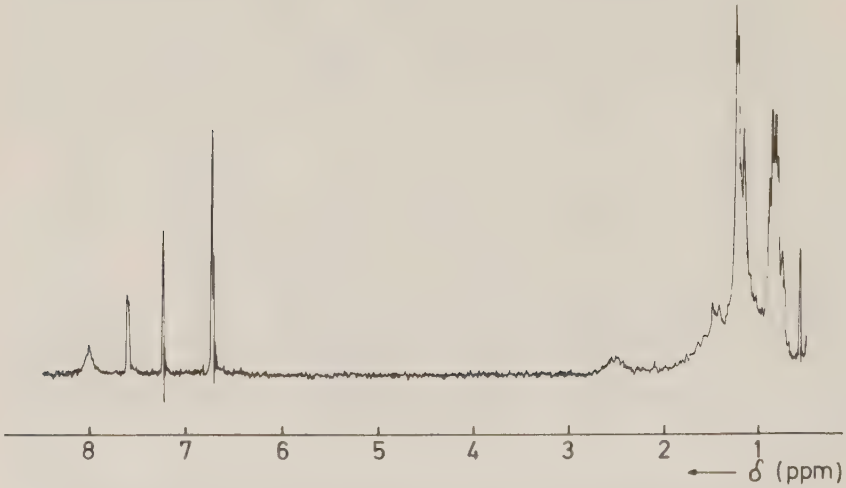
Das breite Maximum bei 380 nm könnte von dem n-π^*-Übergang der Carbonylgruppen herrühren [26]. Außerdem sind Maxima bei 256 und 224 nm vorhanden. In saurer Lösung verändert sich das Spektrum nicht, Alkali dagegen verschiebt das Hauptmaximum bathochrom (von 256 auf 294 nm).



Abbild. 26 : UV-Spektrum des Abbauchinons 21 (——), des Methoxychinons 25a (x-x-) und des Leucoacetats 26 (----) in Methanol

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 27) erkennt man neben den Signalen der gesättigten aliphatischen C_{13}-Kette ($\delta = 0 - 3$) das NH-Signal bei $\delta = 8.01$ und zwei schwach strukturierte Signale bei $\delta = 6.75$ (2 H) und 7.61 (1 H), die den Protonen

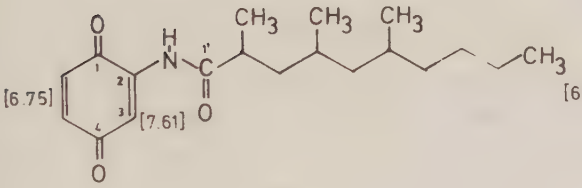
am Chromophor (C_6-Teil) zugeordnet werden müssen.



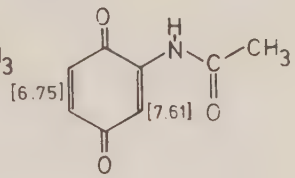
Abbild. 27: ^{1}H-NMR-Spektrum des C_{19}-Abbauchinons 21 in $CDCl_3$

Das Molekül enthält sechs Doppelbindungsäquivalente, von denen eines auf die Amid-CO-Gruppe und fünf auf den Chromophor entfallen. Dem ^{1}H-NMR-Spektrum nach sind die drei Protonen im Chromophor an Doppelbindungen gebunden, die mit Carbonylgruppen konjugiert sind, denn isolierte olefinische Doppelbindungen sollten nach der Hydrierung nicht mehr vorhanden sein, zumal auch die zur Amid-Gruppe konjugierten Doppelbindungen der C_{13}-Seitenkette hydriert wurden. Es mußten also Doppelbindungen vorliegen, die gegenüber nicht zu drastischen Hydrierungsbedingungen stabil sind. Dies wäre bei einem Aromaten der Fall, aber auch bei einem Chinon, das intermediär zum Aromaten wird. Da insbesondere das UV-Spektrum für ein Chinon

spricht, hat das Molekül die Konstitution 21 . Ein o-Chinon ist aufgrund der chemischen Verschiebung und der Kopplung der drei Chinon-H-Atome im ^{1}H-NMR-Spektrum auszuschließen.



21



22

Zum weiteren Beweis synthetisierte ich 2-Acetamino-1,4-benzochinon (22) durch Oxidation von 2-Acetamino-phenol mit Fremy-Salz [27]. Das UV-Spektrum von 22 stimmt, auch in alkalischem Milieu, mit dem des C_{19}-Abbauchinons 21 überein. Im ^{1}H-NMR-Spektrum haben die Chinon-Protonen gleiche δ-Werte (vgl. Formel 21 und 22). Zusammen mit den Ergebnissen über die C_{13}-Acylkette in Kap. 7 und 8c ist damit die Struktur 21 für das C_{19} Abbauchinon bewiesen.

ß) C_{19}-Hydroxy-Abbauchinon

Das Hauptprodukt der Hydrierung des C_{19}-Abbauproduktes aus Manumycin ließ sich nur an sauer aktiviertem Kieselgel chromatographieren, es verhält sich damit wie eine Säure. Im Einklang damit ist die angesäuerte methanolische Lösung gelb, eine neutrale oder alkalische dagegen rot. Die Farbe ist auf das lang-

wellige Maximum bei 480 nm zurückzuführen, das durch Säurezusatz auf 410 nm verschoben wird. Auch die anderen Maxima (310, 232 nm) werden durch Säurezusatz hypsochrom verschoben. Durch Alkalizusatz wird das Methanol-Spektrum nicht verändert, die saure Gruppe ist in Methanol anscheinend schon dissoziiert. Die Bandenverschiebungen deuten insgesamt darauf hin, daß die saure Gruppe zum Chromophor gehört.

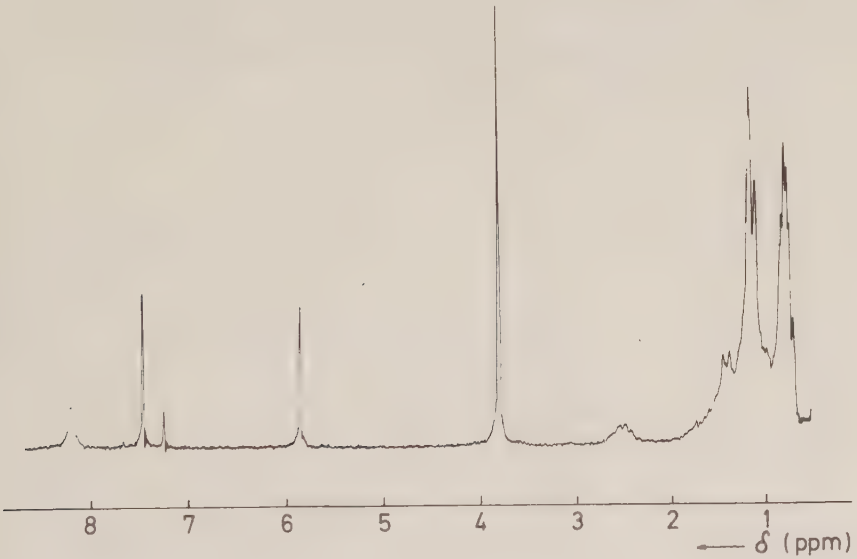
Das gelbrote Hydrierungsprodukt hat die Summenformel $C_{19}H_{29}NO_4$ (hochaufgelöstes Massenspektrum). Es ist aus dem C_{19}-Abbauprodukt formal durch Aufnahme von zwei Mol Wasserstoff entstanden. Das Ion m/e 197 ($C_{13}H_{25}O$) zeigt, daß der Wasserstoff in der C_{13}-Acylkette aufgenommen wurde und der C_6-Teil des Moleküls unverändert die Summenformel $C_6H_4NO_3$ hat.

Die acide Gruppe im Chromophor setzt sich bei Raumtemperatur rasch mit Diazomethan um. Es entsteht ein gelbes Öl, das durch Chromatographie an neutralem Kieselgel mit Chloroform gereinigt wurde. Das gereinigte Methylierungsprodukt hat die Summenformel $C_{20}H_{31}NO_4$ (hochauflösende Massenspektroskopie).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum liegt das Methoxyl-Signal bei $\delta = 3,86$. Es liegt also ein Methylderivat des Hydrierungsproduktes vor. Dieses ist weniger polar als die Ausgangsverbindung und, da keine Dissoziation mehr möglich ist, sind seine Spektren eindeutig interpretierbar. Deswegen wurden weitere Untersuchungen mit dem Methylderivat durchgeführt.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 28) sieht man neben den 25 Protonen der Alkylkette ($\delta = 0-3$) die Signale des Chromophors

(C_6-Teil) : die Methoxyl-Gruppe bei δ = 3.86, zwei scharfe Singuletts bei δ = 5.88 und 7.48 (je 1 H) und das NH-Signal bei δ = 8.21. Im Vergleich zu 21 ist ein Aromat/Olefin-H weniger, dafür die Methoxyl-Gruppe vorhanden.

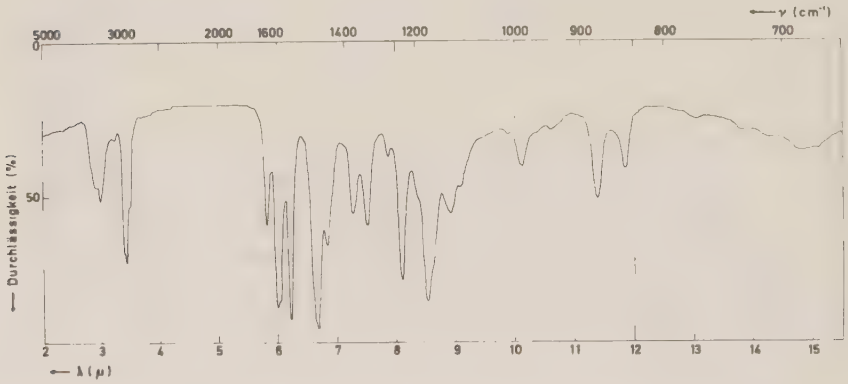


Abbild. 28 : ^{1}H-NMR-Spektrum des C_{19}-Methoxy-Abbauchinons 25a in $CDCl_3$

Die Indikator-Eigenschaften des primär gebildeten Hydrierungsproduktes gehen bei der Methylierung verloren. Das UV-Spektrum des Methylderivates (Abb. 26) ist unabhängig vom pH-Wert der Lösung, lediglich das schwache Maximum bei 400 nm wird durch Alkali um 20 nm bathochrom verschoben. Dieses Maxi-

mum kann wie bei 21 als n, π^*-Übergang von Carbonylgruppen in einem Chinon gedeutet werden. Gegenüber 21 liegt jedoch das Hauptmaximum bei 293 nm (21 : 256) und die Extinktion ist deutlich höher. Dies wäre verständlich, wenn die nachgewiesene Methoxy-Gruppe am Chinonring steht.

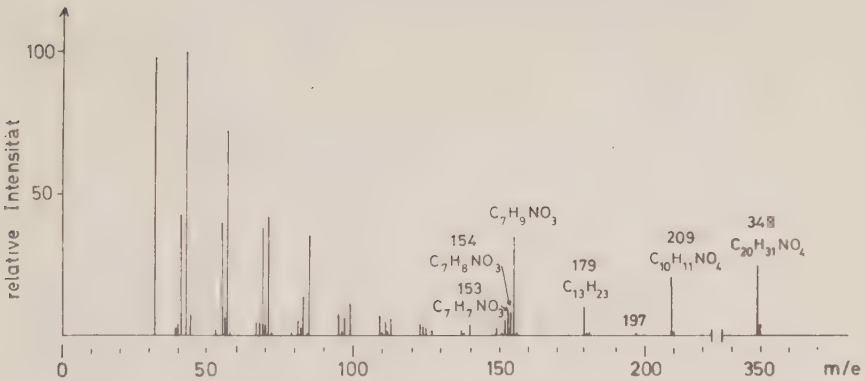
Das IR-Spektrum (Abb. 29) ist mit dem des Abbauchinons 21 (Abb. 25) vergleichbar. Die Bande bei 1667 mit Schultern bei 1672 und 1653 cm^{-1} und die Bande bei 1605 cm^{-1} deuten auf ähnliche Strukturen im Chromophor. Die Bande bei 3344 cm^{-1} stammt von der NH-Gruppe.



Abbild. 29 : IR-Spektrum des C_{19}Methoxy-Abbauchinons 25a in KBr

Das Massenspektrum (Abb. 30) ist weitgehend homolog dem Spektrum der nicht methylierten Verbindung. Ionen, die den Chromophor enthalten, sind jeweils um 14 Masseneinheiten größer. Aus dem Molekül-Ion (m/e 349, $C_{20}H_{31}NO_4$) entsteht durch McLafferty-Umlagerung das Ion m/e 209 ($C_{10}H_{11}NO_4$), durch Spaltung der Acylaminobindung unter Wasserstoffverschiebung das

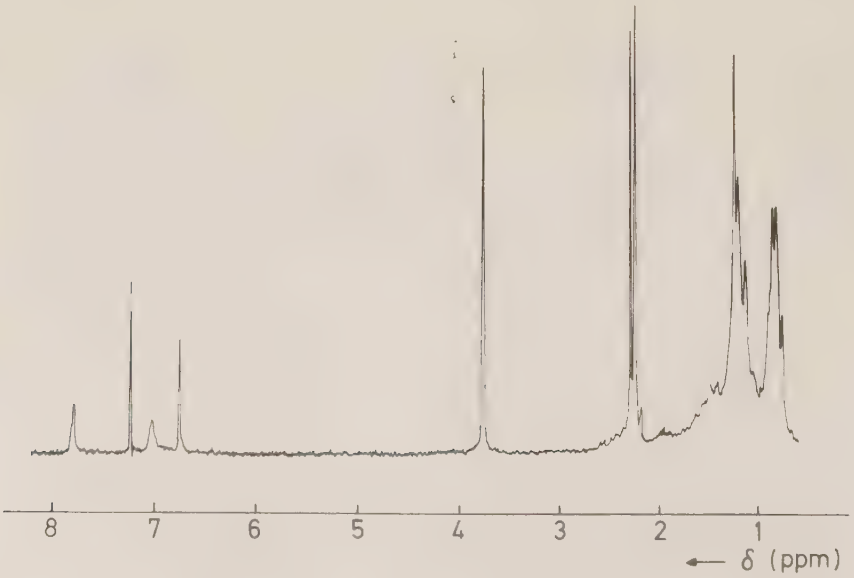
Ion m/e 153 ($C_7H_7NO_3$). Wesentlich intensiver ist jedoch wie bei 21 das um zwei Masseneinheiten größere Ion (m/e 155, $C_7H_9NO_3$), das wieder auf ein Chinon deutet. Die als Fragmente von Chinonen erwarteten Ionen m/e 125 (153 - CO) und 97 (153 - 2 CO) sind zwar vorhanden, konnten aber auch hier nicht hochaufgelöst werden. Das Ion m/e 197 zeigt die gesättigte C_{13}-Acylkette, m/e 140 ist das andere Produkt der McLafferty-Umlagerung ($C_{10}H_{20}$). Die Summenformel des Ions m/e 179 wurde zu $C_{13}H_{23}$ bestimmt. Eventuell entsteht dieses Ion durch Wasserabspaltung aus dem Ion m/e 197.



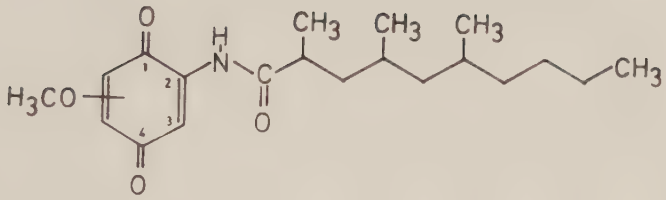
Abbild. 30 : Massenspektrum des C_{19}-Methoxy-Abbauchinons 25a

Die spektroskopischen Daten legen es nahe, das methylierte Hydrierungsprodukt des C_{19}-Abbauproduktes des Manumycins als Methoxychinon 23 zu formulieren. Zum Beweis wurde 23 reduzierend acetyliert und das Reaktionsprodukt chromatographisch gereinigt. Nach Ausweis seines ^{1}H-NMR-Spektrums liegt ein

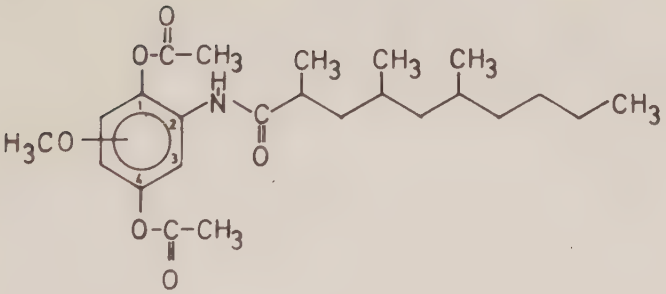
Diacetat vor (Abb. 31, δ = 2.28 und 2.32 ; IR : Acetat-CO bei 1767 und 1757 cm^{-1}). Das Methoxyl-Signal liegt bei δ = 3.78 . Stark verändert sind die Signale im Aromat/Olefin-Bereich. Das eine Signal ist von δ = 5.88 auf 6.77 (scharf) verschoben, das andere von δ = 7.48 auf 7.81 (verbreitert) . Das NH-Signal liegt bei δ = 7.03 (IR : Amid-CO bei 1667 cm^{-1}). Das UV-Spektrum (Abb. 26) ist völlig verändert, wie es nach der reduzierenden Acetylierung eines Benzochinons zu erwarten ist. Das Massenspektrum bestätigt die Leukoacetat-Struktur (M^+ bei m/e 435 = 349 + 2 x 43, m/e 155 : M - 2 Keten - $C_{13}H_{24}O$) . Damit kann man das Leukoacetat als Acylamino-methoxy-hydrochinon-diacetat 24 formulieren.



Abbild. 31 : ^{1}H-NMR-Spektrum des Leukoacetats 26 in $CDCl_3$

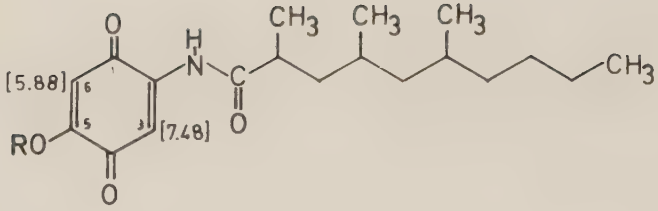


23



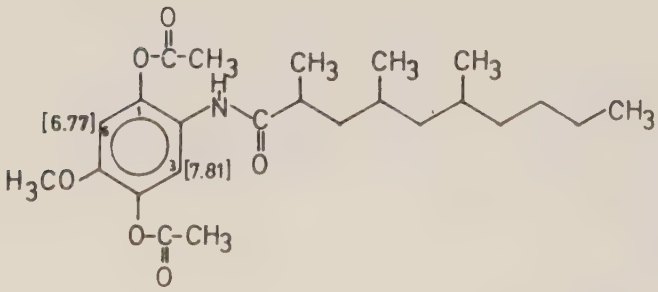
24

Die Tatsache, daß die beiden Chinon-Wasserstoffatome in 23 nicht miteinander koppeln, macht ihre para-Stellung wahrscheinlich. Für meta-ständige Protonen findet man bei 1,4-Benzochinonen Kopplungskonstanten von 2.2-2.5 Hz, während die para-Kopplungskonstanten <0.5 Hz sind [29]. Im Hydrochinon dürften die para-Kopplungskonstanten wie bei anderen Benzolderivaten ebenfalls sehr klein sein. Damit kann man das C_{19}-Methoxy-Abbauchinon als 25a und das Leukoacetat als 26 formulieren. Das Hydroxy-Abbauchinon hat dann die Struktur 25b .



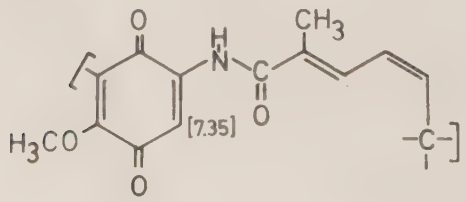
25a: R = CH_3

b: R = H



26

Im Geldanamycin (Partialformel 27) liegt ein 25a analoges Strukturelement vor [30]. Dort liegt das Signal des 3-H bei δ = 7.35. Also kann man in 25a das 7.48-Signal dem 3-H und das 5.88-Signal den 6-H zuordnen. Für das Leukoacetat ergibt sich eine entsprechende Zuordnung. Dort ist das 6-H-Signal scharf (δ = 6.77), während das 3-H-Signal schwach aufgespalten ist, was auf Wechselwirkung mit der NH-Gruppe zurückgeführt werden muß.



27

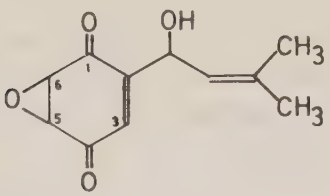
γ) Folgerungen aus den Strukturen der Abbauchinone 21 und 25a

Aus den C_{19}-Abbauchinonen 21 und 25a folgt, daß dem C_6-Rest des C_{19}-Abbauproduktes, das bei der Chromsäureoxidation des Manumycins entsteht, ein carbocyclischer Sechsring zugrunde liegt, der aus zwei Carbonylgruppen, einer C=CH-Gruppierung und zwei nicht äquivalenten Methingruppen gebildet wird sowie ein ätherartig gebundenes Sauerstoffatom trägt.

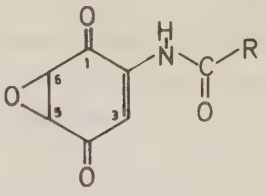
Da bei der Hydrierung nach Aufarbeiten der Reaktionslösung an der Luft Chinone entstehen, muß die Chinonstruktur weitgehend vorgebildet sein, d.h. insbesondere die Carbonylgruppen befinden sich in para-Stellung zueinander. Da aufgrund der Zahl der Doppelbindungsäquivalente ein zweiter Ring vorhanden sein muß, sollte das Sauerstoffatom an diesem beteiligt sein. Die chemische Verschiebung (δ = 3.80 und 3.94), das Kopplungsmuster (AB-System) und die Kopplungskonstante (J_{AB} = 3.5 Hz) der beiden Methin-H-Atome im C_6-Rest sind von der Art und Größe, wie man sie bei Epoxyden, speziell para-Chinonoxyden findet. So geben die Epoxyd-Protonen des Panepoxydions (28) Signale bei δ = 3.1 (J_{AB} = 3.8 Hz, in C_6D_6) [31]. Für die Epoxyd-Protonen im C_{19}-Abbauprodukt findet man in C_6D_6 δ = 3.17 und J_{AB} = 4 Hz. K. Tori fand in α, ß-Ketosteroiden chemische Verschiebungen um δ = 3.7 und AB-Kopplungskonstanten um 3.9 Hz (in $CDCl_3$) [31]. Auch das stimmt mit den Werten des C_{19}-Abbauproduktes (in $CDCl_3$) überein.

Somit gehören im C_6-Rest des C_{19}-Abbauproduktes des Manumycins die beiden CH-Gruppen zu einem Epoxyd-Ring (Oxiran), der den AB-Teil des ABX-Systems verursacht. Es bleibt dann für die Acylamino-Gruppe nur die 2- bzw. 3-Stellung an der Doppelbindung

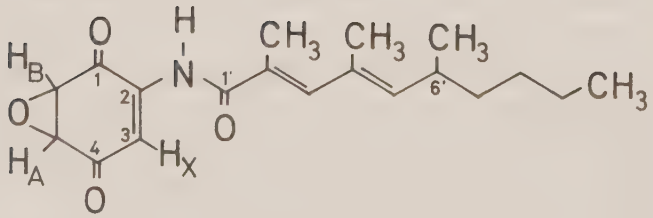
des Sechsringes übrig. Da beide Stellungen chemisch äquivalent sind, ergibt sich Partialformel 29a (2-Acylamino-5,6-epoxy-1,4-benzochinon) für den C_6-Rest. Damit läßt sich Partialformel 20 des C_{19}-Abbauproduktes zu 30 erweitern.



28



29a : R = $C_{12}H_{25}$
b : R = CH_3



30

30 steht mit den spektroskopischen Daten in Einklang und erklärt die gefundenen Hydrierungsprodukte (vgl. Abschnitt e). Das ABX-System wird von 5-H (H_A), 6-H (H_B) und 3-H (H_X) verursacht. H_A koppelt mit H_B und wird zusätzlich von H_X in einer "W-Kopplung" über vier Bindungen aufgespalten (J_{AX} = 2.5 Hz) [31, 33].

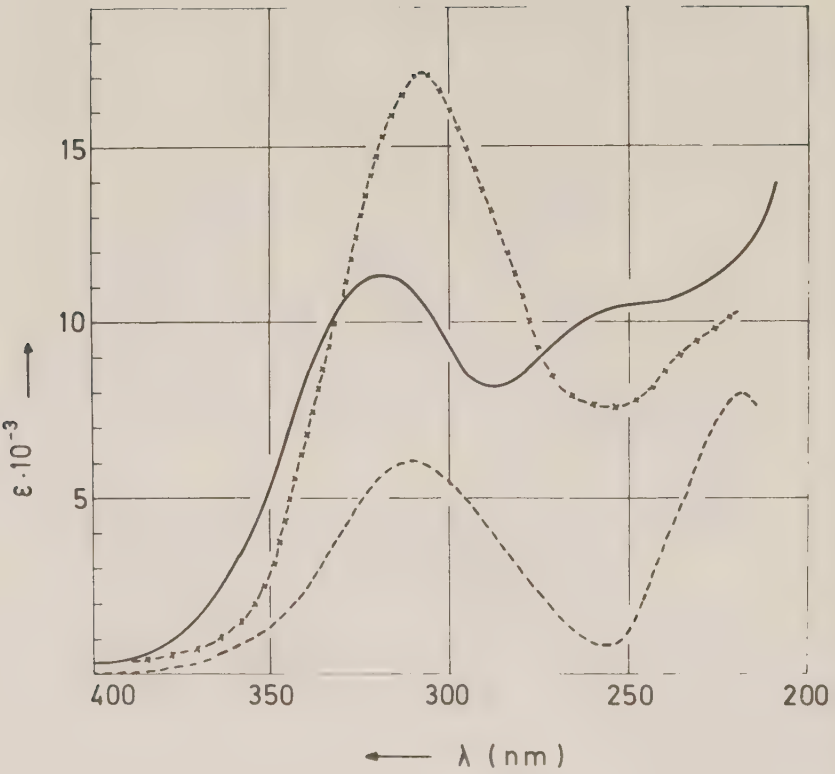
Zum Beweis synthetisierte ich 2-Acetamino-5,6-epoxy-1,4-benzochinon (29b) durch Epoxydierung von 2-Acetamino-1,4-benzo-

chinon (22) mit Natriumperborat [28]. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 29b zeigt genau die Signale, die auch der C_6-Teil des C_{19}-Abbauproduktes 30 verursacht. In Tabelle 4 sind zum Vergleich die ^{1}H-NMR-Daten des C_{19}-Abbauproduktes 30 und des synthetischen Epoxyds 29a zusammengestellt.

Die UV-Spektren der beiden Verbindungen zeigt Abb. 32. Es fällt auf, daß das Extinktionsmaximum von 29b deutlich kleiner ist und bei etwas kleinerer Wellenlänge liegt. Außerdem fehlt im Spektrum von 29b das Maximum bei 245 nm. Das könnte man darauf zurückführen, daß die ungesättigte Seitenkette im C_{19}-Abbauprodukt 30 ein weiteres chromophores System ist, das mit dem C_6-Teil in Konjugation steht und das 245 nm-Maximum verursacht.

Tab. 4 : ^{1}H-NMR-Signale des C_6-Teils im C_{19}-Abbauprodukt 30 und 2-Acetamino-5,6-epoxy-1,4-benzochinon (29b) in $CDCl_3$ (δ-Werte in ppm)

	30	29b		
3-H	7.51 d	7.52 d	J_{AX} = 2.5 Hz	H_X
5-H	3.80 dd	3.81 dd	J_{AB} = 3.5 Hz J_{AX} = 2.5 Hz	H_A
6-H	3.94 d	3.90 d	J_{AB} = 3.5 Hz	H_B
N-H	8.31	7.85		
Acetyl-CH_3	-	2.22 s		



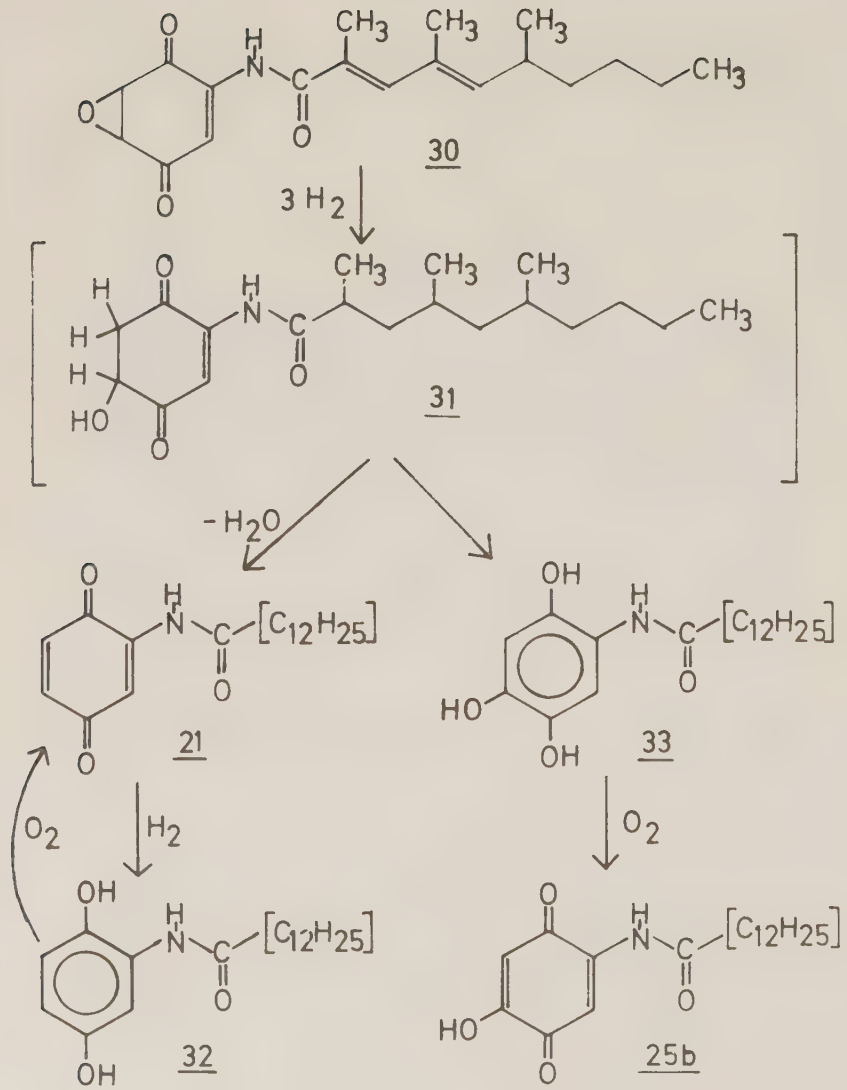
Abbild. 32 : UV-Spektrum des C_{19}-Abbauproduktes 30 in Methanol (——) und Methanol/NaOH (-x-x-).
UV-Spektrum des Acetamino-5,6-epoxy-1,4-benzochinons (29b) (----) in Methanol .

Die 2- und 3-Stellung des C_6 Teils sind zwar chemisch äquivalent, doch verhalten sich 2- und 3-Acylaminoverbindung wie Bild und Spiegelbild, sie sind Enantiomere. Somit setzt sich der gemessene Drehwert von 30 ($[\alpha]_D^{20} = -8.1^o$) aus dem Beitrag des

Chiralitätszentrums C-6' und dem der Epoxy-Gruppe zusammen, weil der Epoxidring in Abbauprodukt 30 noch seine native Konfiguration hat.

e) Der Verlauf der Hydrierung des C_{19}-Abbauproduktes 30

Bei der Hydrierung nimmt das C_{19}-Abbauprodukt 30 3.5 Mol Wasserstoff auf. Geht man von dem Hauptprodukt der Hydrierung, dem Hydroxy-Abbauchinon 25b , aus, so sollten nur zwei Mol aufgenommen worden sein. Diese Diskrepanz läßt sich mit dem Verlauf der Hydrierung erklären (vgl. Reaktionsschema). Die beiden Doppelbindungen der Acylkette nehmen zwei Mol Wasserstoff auf, der Epoxydring wird durch ein weiteres Mol zur Zwischenverbindung 31 aufhydriert. 31 kann Wasser abspalten, es entsteht das Chinon 21 , das weiter zum Hydrochinon 32 hydriert wird. Beim Aufarbeiten an der Luft wird 32 dann wieder zu 21 dehydriert. Zur Hauptsache wird 31 unter den gewählten Reaktionsbedingungen jedoch nicht dehydratisiert, sondern enolisiert zum Hydroxy-Hydrochinon 33 , das an der Luft zum Chinon 25b oxidiert wird. Der Nebenweg der Dehydratisierung von 31 erklärt die Aufnahme von etwas mehr als drei Mol Wasserstoff. Als Nebenreaktion wäre noch die Hydrierung der 2-Doppelbindung in 30 oder 31 denkbar, nach entsprechenden Reaktionsprodukten wurde jedoch nicht gesucht. Die Summe der Ausbeuten an 21 und 25b beträgt 81% (davon 69% 25b) , so daß Nebenreaktionen nicht ins Gewicht fallen.


30
3 H2
31
-H2O
21
33
O2
H2
O2
32
25b

9. Die Konstitution des Manumycins

Aus dem Vergleich der ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren des Manumycins und des C_{19}-Abbauprodukts 30 ergibt sich, daß das C-N-Gerüst und die daran gebundenen H-Atome in 30 unverändert sind (vgl. Tab. 5). Lediglich die Signale des C_6-Teiles sind bei gleicher Multiplizität etwas verschoben. Auffällig ist das bei den Signalen für H_A und H_B : im Spektrum des C_{19}-Abbauprodukts liegt H_A bei höherem Feld als H_B, im Manumycin-Spektrum ist es umgekehrt. Das ABX-System läßt sich aber auch im Manumycin durch Doppelresonanz nachweisen. Es ist also in der Nähe des ABX-Systems, aber nicht an ihm, bei der Oxidation zu 30 eine Veränderung eingetreten.

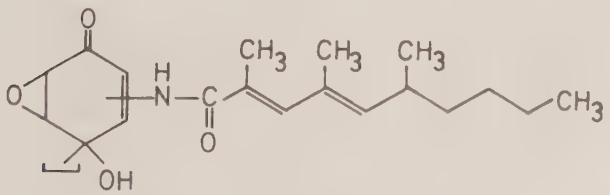
Da die anderen C-Átome den Spektren nach unverändert sind, kommt als Bindungsort des Restmoleküls nur eines der beiden C-Atome der Carbonylgruppen in Frage (C-1 oder C-4). Beim Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren ergibt sich, daß nur eine der beiden Carbonylgruppen nativ ist (Signal Nr. 17 in 30 und 29 im Manumycin, Tab. 5). Das andere Carbonylsignal (Signal Nr. 18 in 30) hat keine Entsprechung im Manumycinspektrum. Dafür erkennt man dort bei $\delta = 71.17$ (Signal Nr. 12) ein Signal für ein quartäres sp^3-C-Atom, das der chemischen Verschiebung nach an Sauerstoff gebunden sein muß. Bei $\delta = 4.28$ liegt im ^{1}H-NMR-Spektrum des Manumycins das Signal einer Hydroxylgruppe, die an ein quartäres C-Atom gebunden ist. Ein anderes C-Atom kommt als Bindungsort für diese Hydroxylgruppe nicht in Frage, da alle anderen C-Atome durch das C_{19}-Abbauprodukt 30 und das 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on (6a) schon zugeordnet sind. Der Rest des Moleküls muß also nach Partialformel 34 an das C_{19}-Abbauprodukt gebunden sein.

Tab. 5 : ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Signale des C_{19}-Abbauprodukts (30) und des Manumycins

C-Atom	Hybridisierung	Zahl der H-Atome	^{1}H-NMR (δ-Werte in ppm) 30 $C_{19}H_{25}NO_4$	^{1}H-NMR (δ-Werte in ppm) Manumycin	^{13}C-NMR (δ-Werte in ppm) 30 $C_{19}H_{25}NO_4$		^{13}C-NMR (δ-Werte in ppm) Manumycin	
1	sp^2	-			188.51 s	17	189.17 s	29
2	sp^2	-			139.10 ? s	13	nicht zu zu ordnen	
3	sp^2	1	7.51 d J = 2.5 Hz	7.38 d J = 2.5 Hz	114.93 ? d	10		
4	sp^2, sp^3	-			191.10 s	18	71.17 s	12
5	sp^3	1	3.80 dd J = 3.5 Hz J = 2.5 Hz	3.72 dd J = 4.0 Hz J = 2.5 Hz	52.58 d	8	52.77 d	10
6	sp^3	1	3.94 d J = 3.5 Hz	3.62 d J = 4.0 Hz	53.87 d	9	57.41 d	11
1'	sp^2	-			168.44 s	16	168.96 s	27
2'	sp^2	-			127.88 s 129.93 s	11 12		
3'	sp^2	1	6.86 s breit	6.77 s breit	143.95 d 141.69 d	15 14	nicht zu zu ordnen	
4'	sp^2	-			129.93 s	12		
5'	sp^2	1	5.41 d breit J = 10 Hz	5.33 d breit J = 10 Hz	127.88 s 141.69 d	11 14		
6'	sp^3	1	2.48 m breit	2.56 m verdeckt	143.95 d 32.94 d	15 6	32.87 d	8
7'	sp^3	2			37.04 t	7	37.07 t	9
8'	sp^3	2	1.30 s breit	1.26 s breit	29.82 t	5	29.77 t	6
9'	sp^3	2			22.80 t	4	22.82 t	4
10'	sp^3	3	0.89 t J = 6 Hz	0.88 t J = 6 Hz	13.85 q	1	14.04 q	1
11'	sp^3	3	2.08 d J = 1.6 Hz	2.04 s breit	20.43 q	3	20.70 q	3
12'	sp^3	3	1.86 d J = 1.6 Hz	1.82 s breit	16.33 q	2	16.50 q	2
13'	sp^3	3	1.00 d J = 6 Hz	0.98 d J = 6 Hz	13.85 q	1	14.04 q	1

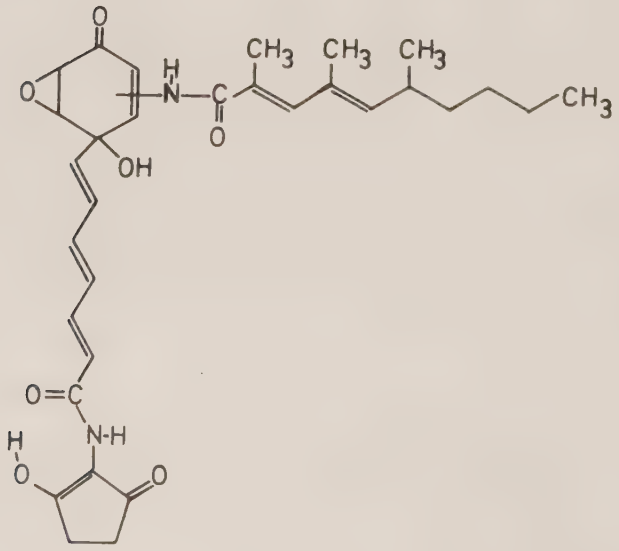
In Tab. 5 sind zum Vergleich die NMR-Daten des C_{19}-Abbauprodukts und die entsprechenden Signale der Manumycin-Spektren zusammengefaßt. Soweit möglich, wird auch eine Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale gegeben. Sie stützt sich im Carbonylbereich auf die chemische Verschiebung und den Vergleich der beiden Spektren. Die Zuordnung im Aliphatbereich ist zum Teil noch nicht sicher. Anhand der Multiplizität und der chemischen Verschiebung lassen sich die Signale Nr. 1 und 4 - 7 im Spektrum des C_{19}-Abbauprodukts sicher zuordnen. Für die anderen Signale im Aliphatbereich und die Olefin-Signale können nur alternative Vorschläge gemacht werden. Für die analogen Signale im Manumycin-Spektrum gilt die Zuordnung entsprechend, außer daß über die Zuordnung der Signale im Olefinbereich wegen der großen Anzahl der Signale vorerst keine Aussagen möglich sind. Die Signale des 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on-Teiles des Manumycins sind schon in Kap. 6 besprochen worden.

Bei der Isolierung und Charakterisierung des 2-Acetamino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-ons (6b) war dargelegt worden, daß dieser Molekülteil auch im Manumycin als Amid gebunden sein muß, da die Chelierung der enolischen Hydroxylgruppe nur zum Amid-Carbonyl möglich ist.



Zählt man die jetzt zugeordneten Atome der Partialformel 34 und des 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on-Teiles zusammen und bildet die Differenz zur Summenformel des Manumycins, so bleib C_6H_6 übrig. Entsprechend bleiben im ^{13}C-NMR-Spektrum des Manumycins nach Abzug der Signale der in den gesicherten Partialstrukturen enthaltenen C-Atome Signale für sechs sp^2-CH-Gruppen übrig. Diese müssen eine Trienkette bilden, die zwischen Partialformel 34 und 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on + Carbonylgruppe einzufügen ist.

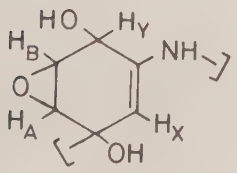
Damit ergibt sich für Manumycin die vorläufige Struktur 35 .



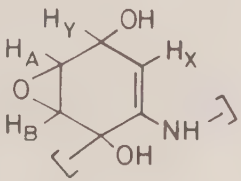
35

Die Isolierung von Korksäure als Dimethylester 10a findet dann folgende Erklärung : Im Hydro-manumycin ist die C_6-Kette (C-7 - C-12) gesättigt. Bei der Oxidation wird dann C-4 zur Carboxylgruppe oxidiert und die C-13-N-Bindung hydrolytisch gespalten, eventuell nach vorheriger Oxidation des C_5-Teils. Die entstandene Korksäure kann aus keinem anderen Molekülteil stammen, da sonst keine so lange unverzweigte Kette vorliegt.

Unklar bleibt zunächst noch, ob die Acylaminogruppe in 35 an C-2 oder C-3 gebunden ist. Zwar spricht die chemische Verschiebung des H_X-Signals (δ = 7.58) für ein Proton am ß-Atom eines α,ß-ungesättigten Ketons, andererseits erwartet man das 5-H (H_A) bei höherem Feld als H_B, was nicht der Fall ist (H_A : δ = 3.72, H_B: δ = 3.62). Um die Stellung der Acylaminogruppe eindeutig zu klären, versuchte ich, die 1-Carbonylgruppe mit Natriumborhydrid selektiv zu reduzieren. Dabei sollte ein Dihydro-manumycin der Partialstruktur 36 oder 37 entstehen. In 36 sollten H_A, H_B und H_X weiterhin ein ABX-System geben, wobei H_B zusätzlich mit H_Y in Wechselwirkung steht. Wenn 37 gilt, dürfte H_B weiterhin nur mit H_A koppeln, und das H_A- und das H_X-Signal sollten durch H_Y zusätzlich aufgespalten sein.



36



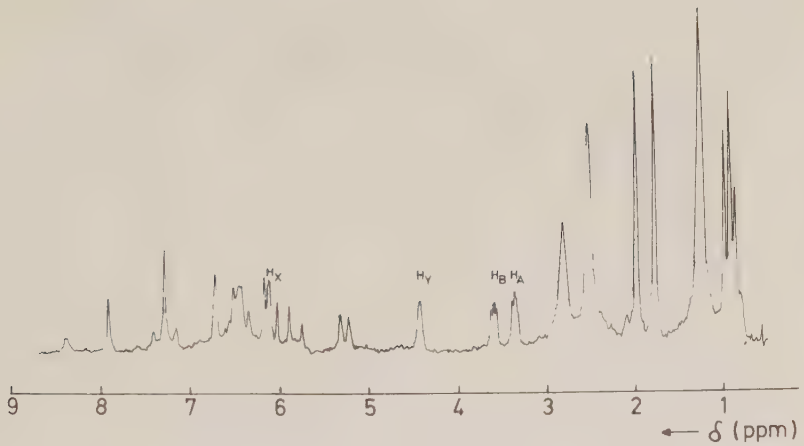
37

Weiter ist zu erwarten, daß von 36 und 37 Isomere mit exo- und endo-ständiger Hydroxylgruppe an C-1 entstehen. Eine dirigierende Wirkung der anderen Substituenten bei der Reduktion ist jedoch nicht auszuschließen und die beiden Diastereomeren sollten sich trennen lassen.

Reduktion mit Natriumborhydrid in Methanol ergab nach Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Chloroform neben 13% einer gelben Begleitverbindung in 78% Ausbeute Dihydro-manumycin. Ob die exo- und endo-Form vorliegt, wurde bisher nicht untersucht. Lediglich aus Abschätzung des Diederwinkels H_B/H_Y im Dreiding-Modell (ca. 80° für exo-und ca. 30° für endo-Form) und der Kopplungskonstante (J_{BY} = 2,5 Hz) wird die exo-Form wahrscheinlicher. Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Dihydro-manumycins (Abb. 33) zeigt H_A (δ = 3,36), H_B (δ = 3,61) und H_Y (δ = 4,44). H_X liegt jetzt halb verdeckt bei δ = 6,14 als verbreitertes Singulett. Durch ^{1}H-Doppelresonanzversuche (vgl. Tab. 6) wird die Partialstruktur 36 für Dihydro-manumycin bewiesen. Durch Einstrahlen des 4,44-Signals (H_Y) wird das H_B-Signal (δ = 3,61) zum Dublett (J_{AB} = 4,4 Hz). Umgekehrt wird das H_Y-Signal beim Einstrahlen des 3,61-Signals scharf. Strahlt man die H_A-Frequenz ein, so wird das H_X-Signal scharf, umgekehrt wird das H_A-Signal ein scharfes Dublett bei Einstrahlen des H_X-Signals.

Tab. 6 : ^{1}H-Doppelrsonanzversuche am Dihydro-manumycin (36)

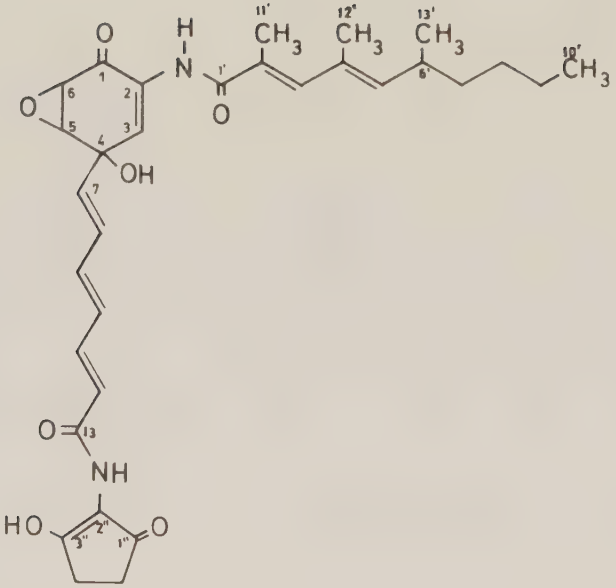
Einstrahlung	Zuordnung	entkoppeltes Signal	Vereinfachung	Zuordnung
4,44	H_Y	3,61	4 Linien in 2	H_B
3,61	H_B	4,44	Verschärfung	H_Y
3,36	H_A	6,14	Verschärfung	H_X
6,14	H_X	3,36	4 Linien in 2	H_A



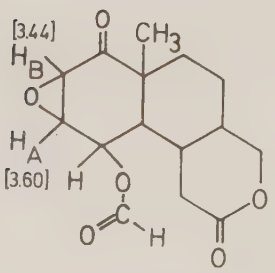
Abbild. 33 : ^{1}H-NMR-Spektrum des Dihydro-manumycins (36) in $CDCl_3/CD_3OD$

Das beweist die 2-Stellung der Acylaminogruppe und damit Konstitution 38 für Manumycin .

Oben wurde angesprochen, daß die relativen Signallagen von H_A und H_B anders sind, als nach der Struktur 38 zu erwarten wäre. Ähnlich sind die Verhältnisse in Verbindung 39, einem Abbauprodukt aus dem Bitterstoff Palmarin [34], in der die Signale von H_A und H_B eindeutig zugeordnet sind. Auch hier liegt das Signal von H_B bei höherem Feld als das von H_A, wie im Manumycin. Die Struktur des Manumycins und damit des Dihydromanumycins und des C_{19}-Abbauprodukts 30 ist dadurch nochmals gesichert, so daß eine Erklärung anderweitig gesucht werden muß. In Tabelle 7 sind die ^{1}H-NMR-Signale des C_6-Teiles von 30 , 38 und 36 zusammengestellt .



38



39

Tab. 7: Signallagen von H_A, H_B, H_X und H_Y im C_{19}-Abbauprodukt 30, Manumycin 38 und Dihydro-manumycin 36 in $CDCl_3$ (δ-Werte in ppm)

	30	38	36
H_A	3.80	3.72	3.36
H_B	3.94	3.62	3.61
H_X	7.51	7.38	6.14
H_Y			4.44
	$\delta_{H_A} < \delta_{H_B}$	$\delta_{H_A} > \delta_{H_B}$	$\delta_{H_A} < \delta_{H_B}$

Die relativen Lagen von H_A und H_B im C_{19}-Abbauprodukt 30 und Dihydro-manumycin (36) sind gleich. Man muß also vermuten, daß die Umkehrung der Verhältnisse im Manumycin auf das Vorhandensein nur einer Carbonylgruppe zurückzuführen ist. Geht man von 30 zu 38, so wird das H_A-Signal in seiner Lage nur schwach beeinflußt (0.08 ppm), während H_B um 0.32 ppm nach höherem Feld verschoben wird. Von Manumycin zu Dihydro-manumycin (36) bleibt die Lage des H_B-Signals praktisch gleich (-0.01 ppm), H_A wird jetzt um 0.36 ppm nach höherem Feld verschoben. In beiden Fällen wirkt sich also der Ersatz einer Carbonylgruppe durch eine Hydroxymethingruppe vornehmlich auf das ß-CH aus.

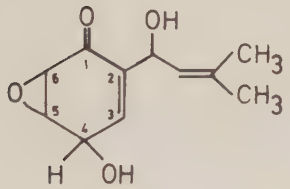
Eine plausible Erklärung für diesen Effekt bietet sich nicht an. Die Anisotropie der Carbonylgruppe wirkt sich am ß-CH nach Abschätzung am Dreiding-Modell nicht aus, lediglich das α-CH sollte um ca. 0.3 ppm entschirmt werden. Der induktive Effekt dürfte sich am ß-CH ebenfalls nur sehr wenig auswirken. Die schwache Anisotropie

des Oxiranringes reicht zur Erklärung nicht aus und sollte sich auf beide Protonen am Ring gleichermaßen auswirken. Es bleibt nur anzunehmen, daß die spezielle Geometrie des Ringsystems, eventuell zusammen mit den oben angeführten Effekten, für die chemischen Verschiebungen der Epoxid-Protonen verantwortlich ist. Um das festzustellen, müßten genauere Untersuchungen an Modellverbindungen durchgeführt werden.

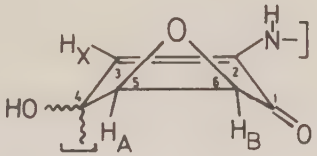
Ob die Doppelbindungen des Manumycins (38) cis-oder trans-Konfiguration haben, konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Für die Acylseitenkette wurde das Problem schon diskutiert. Ich gab bis zum endgültigen Beweis der trans-Konfiguration den Vorzug. Für die Trienkette möchte ich ebenfalls all-trans-Konfiguration annehmen. Das ^{1}H-NMR-Spektrum ist allerdings im Aromat/Olefin-Bereich zu komplex, um aus den Kopplungskonstanten die Konfiguration ableiten zu können. Das IR-Spektrum trägt zur Klärung der Frage auch nichts bei. Die Bande bei 1000 cm^{-1} ist auch im Spektrum des synthetischen Epoxids 29b vorhanden, so daß ich sie dem Oxiranring zuordnen möchte. Wenn cis-Konfiguration nativ vorgelegen haben sollte, so dürfte man doch nach Aufarbeiten am Licht und Umkristallisieren in siedendem Methanol am Licht die all-trans-Form erwarten.

Die Konformation des C_6-Teiles des Manumycins ergibt sich aus dem Vergleich mit dem Pilz-metaboliten Panepoxydon (40) [31]. Die Konformation von 40 wurde aus der genauen Analyse und Interpretation der Kopplungskonstanten zwischen 3-H, 4-H und 5-H abgeleitet. $J_{3,5}$ beträgt in 40 2.5 Hz, denselben Wert findet man auch für Manumycin. Danach bilden 3-H und 5-H im Manumycin und in 40 den gleichen Winkel miteinander, d.h. die analog gebauten Ringe sollten in ihrer Konformation (41) übereinstimmen.

Eine Aussage über die Stellung der Substituenten an C-4 ist so allerdings nicht möglich, da C-4 kein Wasserstoffatom trägt. Auch kann nicht entschieden werden, welche Konfiguration die Chiralitätszentren des Ringsystems haben. Eine Zuordnung mit



40

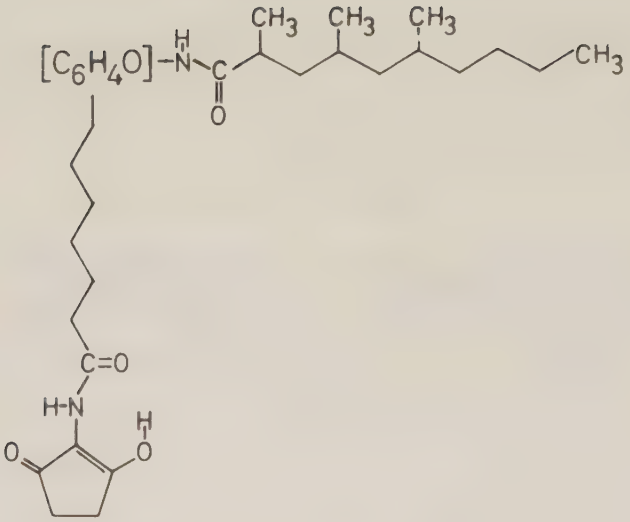


41

Hilfe des CD-Spektrums des Manumycins (Abb. 4, Kap. 3c) ist vorerst nicht möglich, da das chromophore System in 40 anders als das in 38 ist und 38 zusätzlich noch in der C_{13}-Acylkette ein Chiralitätszentrum (C-6') enthält. Untersuchungen der Stereochemie des Manumycins mit Hilfe geeigneter Modellverbindungen stehen noch aus.

10. Zur Konstitution des Hydro-manumycins

Für Hydro-manumycin ergibt sich aus den isolierten Abbauprodukten 6b, 10a und 11 sowie der Strukturformel 38 des Manumycins und der Summenformel des Hydro-manumycins die Partialstruktur 42 .



42

Hinweise auf die Struktur des C_6H_4O-Teiles geben :

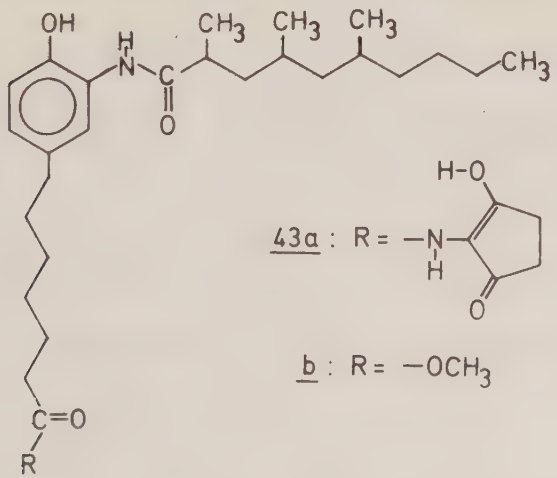
1) Das IR-Spektrum des Hydro-manumycins und seines Methanolyseproduktes (Abb. 9, 819 bzw. 817 cm^{-1}, CH-" out of plane " - Schwingung in 1,4. disubstituierten Aromaten).

2) Das UV-Spektrum des Methanolyseproduktes in Methanol und Methanol/NaOH.

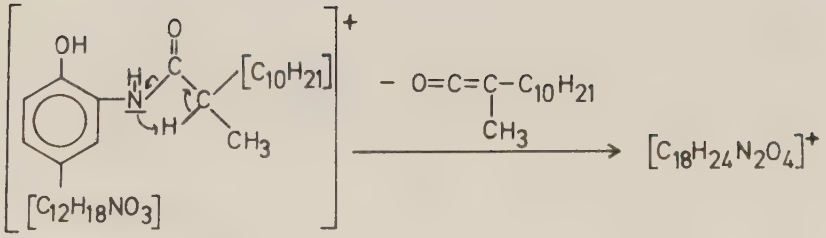
3) Die OH-Signale in den ^{1}H-NMR-Spektren der beiden Verbindungen 43a und 43b (δ = 8,92 bzw. 9,03).

4) Die Massenspektren von Hydro-manumycin (43a , Abb. 7 und 8) und dem Methanolyseprodukt 43b (Abb. 12 und 14).

Die IR-Banden können als CH-"out of plane" -Schwingungen eines 1,4-disubstituierten Aromaten gedeutet werden. Das UV-Spektrum des Methanolyseprodukts 43b spricht nicht gegen ein Phenol, wobei die starke bathochrome Verschiebung der Maxima mit Alkali gut zu einer phenolischen Hydroxygruppe paßt. Die angeführten Signale der ^{1}H-NMR-Spektren passen ebenfalls auf eine phenolische Hydroxygruppe, wobei die Signale im Aromat/Olefin-Bereich nicht gegen ein Phenol sprechen. Damit ergibt sich für Hydro-manumycin die vorerst noch nicht voll gesicherte Struktur 43a und 43b für das Methanolyseprodukt. Am endgültigen Beweis sowie der Klärung des Verlaufs der Hydrierung des Manumycins wird zur Zeit gearbeitet [14].

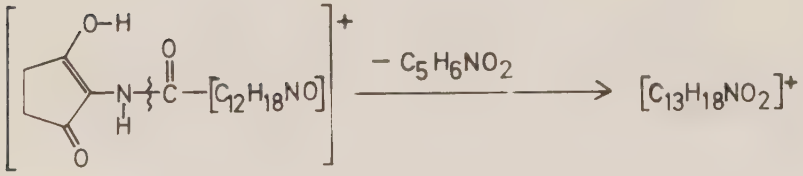


Das Reaktionsschema des Hydro-manumycins im Massenspektrometer (Abb. 8) läßt sich mit der Struktur 43a plausibel erklären. Zuerst bricht unter Wasserstoffverschiebung die C_{13}-Acylkette als Ketenderivat ab ($M^{+} \rightarrow$ a) :



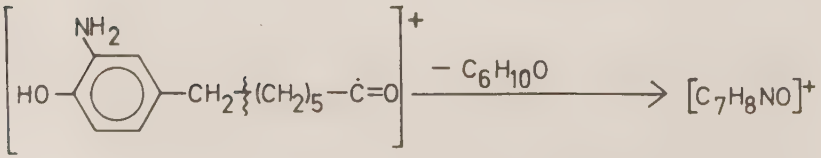
M^+ (m/e 528) a (m/e 332)

Aus dem Ion a ($C_{18}H_{24}N_2O_4$) bricht dann radikalisch 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopentenonyl heraus (a ⟶ b):



a (m/e 332) b (m/e 220)

Zuletzt bricht $C_6H_{10}O$ radikalisch in Benzylstellung ab (b ⟶ c):



b (m/e 220) c (m/e 122)

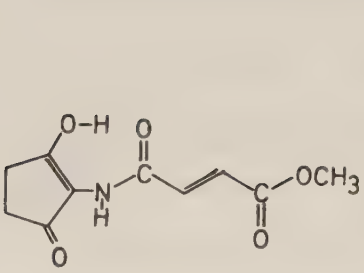
Die letzte Fragmentierung ist ein weiterer Hinweis, daß ein Aromat vorliegt.

11. Vergleich der Konstitution des Manumycins mit anderen Naturstoffen

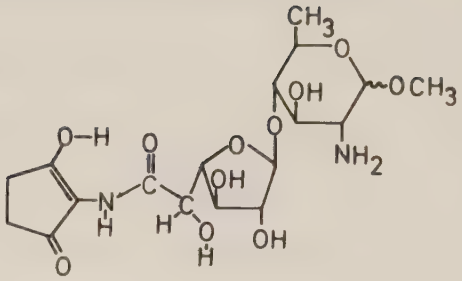
Die Struktur des Manumycins (38) läßt sich in vier Teile gliedern :

1) Der 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on-Teil (6a)
2) Die mit dem Säureamid-CO konjugierte Trienkette
3) Der C_6-Teil mit dem Epoxidring
4) Die als Amid gebundene 2,4,6-Trimethyl-2,4-decadiensäure

Der erste Naturstoff, in dem 2-Amino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on gefunden wurde, ist Flavensomycin [35]. In der daraus durch Methanolyse erhaltenen Flavensomycinsäure (44) liegt 6a als Amid des Fumarsäure-monomethylesters vor [36]. Das Limocrocin (7) [17] war schon genannt worden (Kap. 6). Von einer großen Gruppe phosphorhaltiger Antibiotica scheinen die meisten 6a als Chromophor zu enthalten. Für Moenomycin [15] und Macarbomycin [37] ist dies experimentell nachgewiesen, für die Prasinomycine [38] und Diumycine A und A' [39] den UV-Spektren nach wahrscheinlich. Interessanterweise enthalten die Diumycine B und B' bei gleicher biologischer Aktivität den Chromophor dem UV-Spektrum nach nicht. Abbau des Moenomycins ergab, das 6a dort an Galakturonsäure gebunden vorliegt (Formelbild 45).

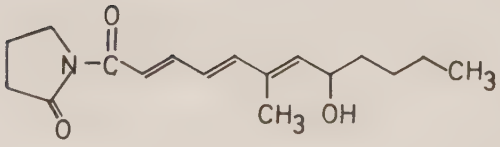


44

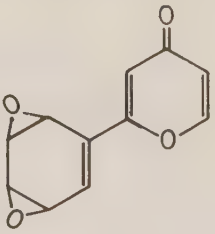


45

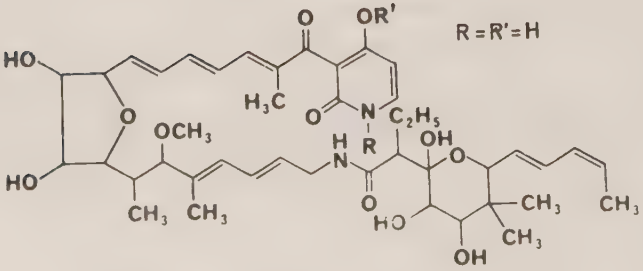
Eine dem Trienamid-Teil des Manumycins entsprechende Struktur findet man im Variotin (46)[40] und Mocimycin (47)[41,42].



46

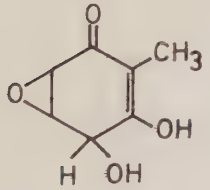


48

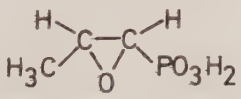


47

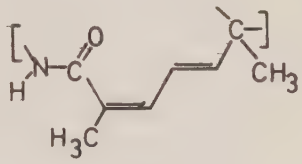
Epoxide spielen beim Abbau von Aromaten in der Zelle eine Rolle [43]. Entsprechende Benzoloxid-Sturkturen sind im Antibioticum LL-Z 1220 (48) gefunden worden [44]. Die beste Übereinstimmung mit der Epoxid-Partialstruktur des Manumycins zeigen Panepoxydon (40) [31], und Terremutin (49) [45], während der Terresäure-methylester [28] eher dem C_{19}-Abbauprodukt 30 vergleichbar ist. Aliphatische Epoxide sind unter den Antibiotica weiter verbreitet. Erwähnt seien Tirandamycin [46] und Streptolydigin [47] sowie einige Macrolide [48], ferner auch das Cerulenin [49] und Phosphonomycin (50) [50].



49

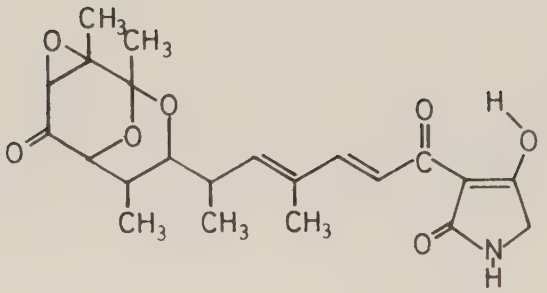


50



51

Die Ansamycine haben als gemeinsames Strukturmerkmal eine lange aliphatische Kette, die, an einer Seite als Amid gebunden, ein π-Elektronen reiches Ringsystem überbrückt [51]. Bei den Rifamycinen zeigt eine Partialstruktur dieser Kette (51) auffallende Ähnlichkeit mit der C_{13}-Acylkette des Manumycins, lediglich die γ-Methylgruppe fehlt. Im Geldanamycin (27) [30] fehlt außerdem die ϵ-Methylgruppe. γ-Methylsubstitution eines Dienons findet man in den schon genannten Streptolydigin [47] und Tirandamycin (52) [46]. Die Konfiguration der Doppelbindungen in den letztgenannten ist all-trans, in den Ansamycinen cis-trans oder trans-cis. Eine der C_{13}-Seitenkette des Manumycins genau entsprechende Struktur ist noch nicht bekannt.



52

Man sieht, daß in einer Reihe von Antibiotica ähnliche Strukturelemente wie im Manumycin vorhanden sind, allerdings nicht in der Kombination und genau der Art wie im Manumycin . Eine direkt vergleichbare Substanz ist in der Natur bisher nicht aufgefunden worden. Man kann das Manumycin also nicht in eine bekannte Klasse von Antibiotica einordnen, es steht mit seinen Strukturmerkmalen bisher isoliert.

12. Zusammenfassung der Ergebnisse

1) Das Antibioticum Manumycin wurde aus Mycel von Streptomyces parvulus (Stamm Tü 64) neu isoliert, durch Flüssig-flüssig-Verteilung und Kristallisation gereinigt und durch seine chemischen Eigenschaften und spektroskopischen Daten charakterisiert. Die neu entwickelte Aufarbeitungsmethode lieferte reinere Präparate und höhere Ausbeuten an Antibioticum als in der Literatur [7] angegeben.

2) Bei der Acetolyse des Manumycins entstand 2-Acetamino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on (6b), das durch seine spektroskopischen Daten und Vergleich mit einem authentischen Präparat identifiziert wurde.

3) Oxidation des Hydro-manumycins (43a) mit Chromsäure lieferte Octandisäure-dimethylester (10a), 2,4,6-Trimethyl-decansäuremethylester (9), und 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid (11), die durch ihre Massenspektren, 11 auch durch sein ^{1}H-NMR- und IR-Spektrum, identifiziert wurden. 11 beweist, daß die C_{13}-Seitenkette im intakten Molekül als Amid vorliegt. 9 und 11 sind Diastereomerengemische.

4) Oxidation des Manumycins mit Chromsäure lieferte 2-(2,4,6-Trimethyl-2,4-decadienoyl)-amino-5,6-epoxy-1,4-benzochinon (30). Die Struktur der C_{13}-Seitenkette ließ sich durch das ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum und ^{1}H-Doppelresonanzversuche sowie das Massenspektrum beweisen. Katalytische Hydrierung überführt 30 in 2-(2,4,6-Trimethyl-decanoyl)-amino-1,4-benzochinon (21) und 2-(2,4,6-Trimethyl-decanoyl)-amino-5-hydroxy-1,4-benzochinon (25a). 21 wurde durch seine spektroskopischen Daten und den Vergleich mit 2-Acetamino-1,4-benzochinon (22) identifiziert. Die Konstitution von 25a wurde durch die spek-

troskopischen Daten seines Methyläthers (25b) und die des Leukoacetats von 25b (26) gesichert. Durch 21 und 25a deren Bildung aus 30 diskutiert wird, und durch den Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren von 30 und geeigneter Modellsubstanzen läßt sich die Epoxid-Struktur von 30 beweisen.

5) Reduktion von Manumycin mit Natriumborhydrid führte zu Dihydro-manumycin (36), dessen ^{1}H-NMR-Signale vom Epoxid-Ringsystem die 2-Stellung der Acylaminogruppe und damit die Konstitution 38 des Manumycins beweisen.

6) Das ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum des Manumycins und das Massenspektrum des Hydro-manumycins werden diskutiert. Die Spektren stehen mit der durch chemischen Abbau bewiesenen Struktur in Einklang.

7) Die Strukturelemente des Manumycins werden mit denen anderer Antibiotica verglichen. Aufgrund der Kombination verschiedener Strukturelemente im Molekül läßt sich Manumycin keiner bekannten Antibiotica-Gruppe zuordnen.

Beschreibung der Versuche

1. Allgemeines

Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte wurden im Berl-Block in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert.

Spektren

Die abgebildeten oder erwähnten Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen :

Elektronenspektren : Zeiss DMR 21

CD-Spektren : Cary 60 (1 cm-Küvette)

IR-Spektren (KBr-Preßlinge) : Perkin Elmer Model 21

^{1}H-NMR-Spektren : Varian HA 100, Tetramethylsilan als innerer Standard, chemische Verschiebung in δ-Werten (in ppm)

^{13}C-PFT-NMR-Spektren : Bruker B-KR-322s/4 - 60 MHz bei 22.63 MHz, Hexafluorbenzol als externer Standard, 16 000 Durchläufe, Pulsbreite 5 µsec , chemische Verschiebung in δ-Werten (δ_{TMS} = 0 ppm, δ_{CDCl_3} = 77.14 ppm)
Varian XL 100, $CDCl_3$ als interner Standard, 550 Durchläufe, Pulsbreite 5 µsec, chemische Verschiebung in δ-Werten (δ_{TMS} = 0 ppm, δ_{CDCl_3} = 77.14 ppm)

Massenspektren : Atlas CH-4 (direkter Einlaß, TO4-Ionenquelle, 70 eV)
Varian MAT SM-1-B (direkter Einlaß, 70 eV), Hochauflösung mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz
Varian MAT CH-7 (70 eV), gekoppelt mit Gaschromatograph Varian Aerograph 1700 (3 m Glassäule, 1.7 mm i.D., 3% Butandioladipat (BDA) auf Chromosorb W/AW/DMCS)

Gaschromatographie : Perkin Elmer F 21, 6 m Glassäule mit 3 mm i.D. 3% BDA auf Chromosorb W/AW/DMCS 80-90 mesh, Einspritzblock und FID 250°C, 20 ml Stickstoff/min.

Mol.-Masse (osmometrisch) : Dampfdruck-Osmometer Mechrolab Modell 301 A (Benzil als Eichsubstanz)

Drehwerte : Polarimeter Perkin Elmer Modell 141

Dünnschichtchromatographie : DC Mikrokarten SIF_{254} (Riedel-de Haen) Oxalsäure-Kieselgelplatten : 10 Glasplatten 10 x 20 cm wurden mit 35 g Kieselgel G (Merck), aufgeschlämmt in 70 ml o.5 N Oxalsäure, beschichtet (0.25 mm), an der Luft getrocknet und 1 h bei 110°C aktiviert.

Säulenchromatographie : Kieselgel unter 0.08 (Merck) und Sephadex LH 20 (Pharmacia). Oxalsäure-Kieselgel : 1 kg Kieselgel unter 0.08 (Merck) wurde mit 2 l 0.5 N Oxalsäure verrührt, in 3-4 cm dicker Schicht 24 h bei 110°C getrocknet, gepulvert und 3 h bei 110°C aktiviert.

2. Beschreibung der Versuche

Kultivierung von Streptomyces parvulus (Stamm TÜ 64)

Der Stamm TÜ 64 wurde auf M_2-Agar (1 % Malzextrakt, 0.4 % Dextrose, 0.4 % Hefeextrakt) in Schrägröhrchen vorgezogen. Mit einem Schrägröhrchen beimpfte man 5 1 Ltr. -Schüttelkolben mit je 150 ml Nährlösung (1% Glucose, 0.5% Hefeextrakt, 0.1% Caseinpepton, 0.1% K_2HPO_4, 0.1% Kochsalz, 0.01% $MgSO_4$, 0.01% $FeSO_4$, 0.01% $CaSO_4$, pH = 7) und schüttelte 2-3 d bei 28°C. 25 dieser Schüttelkolben wurden als Impfmaterial für einen 120 l-Fermenter genommen (2% vollfettes Sojamehl, 2% Mannit, pH = 7). Der pH-Wert der Kulturlösung wurde während der 72 h Kultivierung durch Zugabe steriler 2 N HCl bzw. 2 N NaOH zwischen 6.2 und 6.8 gehalten. Durch Rühren und starke Belüftung (150 l/min) entwickelte sich zeitweise Schaum. Dies verhinderte man durch Zugabe von jeweils 200 ml Niax Polyol PPG 2025 (Union Carbide). Zum Zeitpunkt der Ernte war das Mycel rot (ohne Braunstich).

Aufarbeitung der Kultur

Die Kulturbrühe wurde mit 2 N HCl auf pH = 4-5 eingestellt und mit 5-8 kg Celite verrührt. Dann trennte man in der Filterpresse die festen Bestandteile(Celite mit adsorbierter Substanz und Mycel) ab, das Filtrat wurde verworfen. Der Filterkuchen wurde dreimal mit je 30 l Aceton ausgerührt, und die vereinigten Acetonextrakte im Rotationsverdampfer eingeengt. Es blieb ein wäßr. Rückstand, den man dreimal mit je 4 l Chloroform extrahierte. Nach Eindampfen der vereinigten Chloroformphasen erhielt man ein tiefrotes Öl.

Um Fette und andere unpolare Begleitsubstanzen abzutrennen, goß man das Öl in ca. 20 l Petroläther. Es bildete sich ein dunkelroter Niederschlag. Nach Absitzenlassen über Nacht wurde decantiert,

der Niederschlag in wenig Chloroform aufgenommen und die Chloroformlösung in 5 l Petroläther gegossen. Den Niederschlag zentrifugierte man ab, verrieb ihn mit Seesand und extrahierte in einer Soxhlett-Apparatur 48 h mit Petroläther. Anschließende Extraktion mit Äther (24 h) lieferte nach Verdampfen des Äthers 12.4 g amorphes, rotes Rohprodukt.

Plattendiffusionstest (B. subtilis, synthetisches Medium): 36 mm Hemmhofdurchmesser (0.1 mg/ml), entsprechend 5.6 g Manumycin (47 mg pro Liter Kulturlösung).

Reinigung von Manumycin durch Verteilung

In einer Verteilungsapparatur (Desaga-Ronor, 400 Kammern) trennte man 11.2 g Rohprodukt (in 100 ml Unterphase gelöst) im System Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser 5:4:1 unter folgenden Bedingungen: 18°C, 12 UpM, 0.9 ml/min Oberphase. Stationäre Phase: 3.75 l, mobile Phase: 0.36 l. Es wurde mobile Phase durchgepumpt, bis im Eluat Spuren von Manumycin nachweisbar waren (ca. 5 l). Der Vorlauf enthielt nur Prodigiosin und wurde verworfen. Danach wurden jeweils 100 Kammern zusammen ausgeleert und ihr Inhalt eingedampft. Die Kammern 1-100 (von oben gezählt) ergaben 1.45 g dunkles Öl, das keine biologische Aktivität zeigte und verworfen wurde. Die Kammern 102-200 enthielten 4.7 g fast reines Manumycin ("Ronor-Manumycin"), die Kammern 201-400 ergaben 1.75 g eines Gemisches von Manumycin und einer weiteren gelben, laut Plattendiffusionstest biologisch nicht aktiven Substanz. Nach dem DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) ist ihr Mengenverhältnis etwa 1:1. Die Kammern 101-400 enthielten als Verunreinigung laut DC noch sehr wenig Prodigiosin.

Ronor-Manumycin ergab im Plattendiffusionstest einen Hemmhofdurchmesser von 40 mm (0.1 mg/ml). Das entspricht etwa 95% Manumycin.

Kristallisation von Manumycin

Eine Lösung von 315 mg Ronor-Manumycin in möglichst wenig Chloroform wurde in 200 ml Cyclohexan eingetropft. Der ausgefallene Niederschlag wurde nach 2 h abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute : 230 mg (gelbes Pulver mit schwachem Braunstich).

Das Manumycin-Pulver löste man in 10 ml Methanol und filtrierte in der Siedehitze zweimal über Aktiv-Kohle. Nach Zugabe des halben Volumens Wasser fiel ein gelber amorpher Niederschlag aus, von dem nach 2 h abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat kristallisierten über Nacht 38 mg Manumycin aus (Schmp. 134°C). Der amorphe Niederschlag wurde in Methanol aufgenommen, die Lösung über Aktiv-Kohle filtriert und in der Hitze mit Wasser versetzt. Es kristallisierten über Nacht 38 mg Manumycin aus (Schmp. 136°C). Aus den Mutterlaugen wurden 17 mg bräunlich gelbes, amorphes Manumycin zurückgewonnen. Die Hauptmenge des Manumycins haftete an der Aktiv-Kohle und ließ sich nicht wieder eluieren.

Die beiden kristallinen Präparate wurden zusammen nochmals unter Zusatz von Aktiv-Kohle umkristallisiert. Man erhielt 49 mg Manumycin (blaßgelbe Sternchen). Schmp. 139-141°C (nach Trocknen i. Hochvak. bei Raumtemperatur), $[\alpha]_D^{20}$ = -185° (c = 0.4 in Chloroform) Dieses Präparat war dünnschichtchromatographisch einheitlich (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1, R_F-Wert : 0.55). Manumycin ist gut löslich in Chloroform, Methanol, Aceton, Acetonitril und 2 N Sodalösung, mäßig löslich in Benzol und nicht oder kaum löslich in Petroläther, Cyclohexan, Wasser und 2 N HCl.

$C_{31}H_{38}N_2O_7$ (550,03)	Ber.	C 67.62	H 6.96	N 5.09	O 20.34
	Gef.	C 67.69	H 7.06	N 4.95	O 20.38

Mol.-Masse : 630 (osmometrisch in Chloroform); 550 (aus dem Feld-Desorptions-Massenspektrum, vgl. Abb. 2).

Äquiv.- Masse : 550 ± 10 (potentiometrische Titration in 80 proz. Äthanol mit 0.02 N NaOH).

IR (vgl. Abb. 3): 3400, 3259 cm^{-1} (OH, NH); 1689 (sh), 1667, 1626 (sh), 1616, 1600 cm^{-1} (CO und C=C), 1000 cm^{-1} (Epoxid).

UV (vgl. Abb. 4): λ_{max} (Methanol)= 305 nm (ϵ = 39400), 277 (46800), 264 (47000)

λ_{max} (Methanol/2 Tropfen 2 N NaOH) = 305 nm (ϵ = 40100), 278 (47700), 263 (48800)

λ_{max} (Methanol/2 Tropfen 2 N HCl) = 326 nm (ϵ = 39000), 277 (35800)

λ max (Chloroform) = 332 nm (ϵ = 37300), 277 (34600)

CD (vgl. Abb. 4): λ_{max} (Chloroform) = 325 nm ($[\Theta]^{20}$ = 40000), 288 (46300), 263 (20500)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Abb. 5, Kap. 3cδ, Tab. 5

(d-Aceton) δ = 0.86 (3 H, t, J = 6 Hz), 0.98 (3 H, d, J = 6 Hz), 1.29 (6 H, s, breit), 1.82 (3 H, d, J = 1.6 Hz), 2.04 (3 H, unter Acetonsignal), 2.44 (5 H, s, breit), 3.63 (1 H, d, J_{AB} = 5 Hz), 3.74 (1 H, dd, J_{AB} = 5 Hz, J_{AX} = 3 Hz), 5.30 (OH), 5.34 (1 H, d, breit, J = 10 Hz), 6-8 (komplexe Signalgruppen für 8 H), 8.12 (NH), 8.81 (NH), 13.77 (OH)

(C_6D_6): δ = 0.87 (3+3 H, t+d, J = 7 Hz), 1.20 (6 H, s, breit) 1.62 (3 H, s, breit), 1.85 (3 H, s, breit), 2.16 (5 H, s, breit), 3.31 (1 H, d, J_{AB} = 3.2 Hz), 3.44 (1 H, dd, J_{AB} = 3.2 Hz, J_{AX} = 2.5 Hz), 5.22 (1 H, d, breit, J = 9 Hz), 5.54 (OH), 5.62 (1 H, d, J = 14 Hz), 6-8.7 (komplexe Signalgruppen für 6 H), 7.76 (1 H, d, J_{AX} = 2.5 Hz), 7.98 (NH), 9.00 (NH), 14.61 (OH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, Varian XL 100): Abb. 6, Kap. 3c , Tab. 5

Biologische Aktivität im Plattendiffusionstest gegen Bacillus subtilis auf synthetischem Nährboden (Mittelwerte aus 3 Testreihen)

1000	315	100	31.5	10	3.15	1	µg/ml
48	45	41	36	29	22	14.5	mm Hemmhof-durchmesser

Versuche zur Derivatisierung und Hydrolyse des Manumycins

Acetylierung: Eine Lösung von 147 mg Manumycin in 10 ml Acetanhydrid wurde mit 3 ml Pyridin versetzt und 48 h bei Raumtemperatur belassen. Überschüssiges Acetanhydrid wurde mit 150 g Eis hydrolysiert (6 h), es fiel ein gelber Niederschlag aus, der abfiltriert und getrocknet wurde. Ausb. 173 mg.

Beim Trennen auf Dickschichtplatten (je 60 g Kieselgel HF_{254}, Merck, auf Glasplatten 20x40 cm, Chloroform/Methanol 9:1) zersetzte sich das Reaktionsprodukt, es ließen sich keine einheitlichen Komponenten isolieren.

Methylierung : Man versetzte eine Lösung von 80 mg Manumycin in 10 ml absolutem Dioxan mit 0.1 ml Methyljodid und 250 mg Silber-(I)oxid und rührte 4 h bei Raumtemp. . Dann wurde durch einen Membranfilter abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Ausb. 86 mg. Eine chromatographischen Trennung des Produktgemisches an Kieselgel war nicht möglich, die eluierten Zonen waren nicht einheitlich.

Saure Hydrolyse : a) Zu 12 mg Manumycin in 2 ml Methanol gab man 2 ml o.2 N HCl und rührte 4 d bei Raumtemp.. Danach wurde 4 mal mit je 2 ml Chloroform ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte (braungelbe Lösung) im DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) untersucht. Man erkennt neben braunen Zersetzungsprodukten am Start und nicht umgesetztem Manumycin midestens 5 weitere Flecken, die nur schlecht voneinander getrennt sind. In der Wasserphase waren nach Tüpfeln auf Kieselgel und Ansprühen mit Ninhydrin (0.1 proz., Merck) bzw. 30 proz. Phosphorsäure weder Aminosäuren noch Zucker nachweisbar.

b) 15 mg Manumycin wurden über Nacht mit 1 N HCl (Methanol/Wasser 1:1) unter Rückfluß gekocht und dann wie unter a) aufgearbeitet und untersucht. In der organischen Phase waren nur braune Zersetzungsprodukte nachweisbar, in der wäßrigen Phase keine Aminosäuren oder Zucker.

Hydromanumycin

In einer Hydrierapparatur wurden 146 mg Katalysator (10% Palladium auf Aktiv-Kohle) in 30 ml Methanol suspendiert und bei 20°C und 746 Torr 1 h vorhydriert. Dann gab man 99 mg Manumycin (0.180 mMol) zu . Nach 13 min war die Wasserstoffaufnahme beendet (Verbrauch : 30.55 ml H_2 = 27.90 ml [1.245 mMol] bei Normalbedingungen, entsprechend 7 Mol.-Äquivalenten) . Man

filtrierte vom Katalysator ab und brachte das Filtrat im Vak. zur Trockne. Ausb. 80.0 mg farbloses Öl, das sich im DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 19 : 1) in eine Hauptzone und mindestens 3 weitere Zonen auftrennte.

50 mg des Hydrierungsgemisches wurden an 50 g Kieselgel (Säulendurchmesser 2.5 cm) mit Chloroform/2% Methanol chromatographiert. Es wurden nacheinander eluiert (angezeigt durch Absorption bei 254 nm) :

1) 23 mg Hydromanumycin (43a), das ölig anfiel und beim Stehen erstarrte. Es war chromatographisch einheitlich.

2) 29 mg eines schwach gelblichen Öls, das laut DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9 : 1) mindestens 3 weitere Komponenten enthält. Es wurde bisher nicht weiter untersucht.

Das Hydro-manumycin wurde durch Eintropfen einer konzentrierten Chloroformlösung in Cyclohexan umgefällt . Ausb. 16 mg farbloses, amorphes Pulver, das nach Trocknen i. Hochvak. (60°C) bei 93-95°C schmolz. R_F-Werte und biol. Aktivität siehe Tab. 11.

$C_{31}H_{48}N_2O_5$ (528,71) Ber. 528.3563 Gef. 528.3559 (Hochauflösung)

IR (vgl. Abb. 9) : 3367, 3215, 3145 cm^{-1} (OH, NH) ; 1689, 1653, 1618, 1600 cm^{-1} (CO, C=C), 819 cm^{-1} (CH-out of plane-Schwingung)

UV (vgl. Abb. 10): λ_{max} (Methanol) = 278 nm (sh, ϵ = 11200), 256 (24800), 210 (31300)

λ_{max} (Methanol/1 Tropfen 2 N NaOH) = 313 nm (ϵ = 6000), 257 (31800), 220 (25800)

λ max (Methanol/1 Tropfen 2 N HCl) = 278 nm (ϵ = 9300), 243 (19200), 211 (29100)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : δ = 0.95 (9 H, komplexes Signal), 1-2 (23 H, nicht aufgelöste Signalgruppen), um 2.5 (5 H, m), 2.61 (4 H, s, breit), 6.96 (2 H, s, breit), 7.02 (1 H, s, breit), 7.82 (NH), 8.14 (NH), 8.92 (OH), 13.39 (OH, cheliert)

MS : Abb. 7 und 8. Folgende Ionen wurden durch Hochauflösung zugeordnet :

m/e	Ber.	Gef.	Summenformel
510	510.3457	510.3446	$C_{31}H_{46}N_2O_4$
388	388.1998	388.1989	$C_{21}H_{28}N_2O_4$
332	332.1735	332.1737	$C_{18}H_{24}N_2O_4$
220	220.1337	220.1329	$C_{13}H_{18}N\ O_2$
122	122.0605	122.0601	$C_7\ H_8\ N\ O$
314	314.2483	314.2479	$C_{21}H_{32}N\ O$
114	114.0554	114.0555	$C_5\ H_8\ N\ O_2$

Metastabile Peaks : m/e 284.5, 209, 145.8 und 67.7

Methanolyse von Hydro-manumycin (43a)

Eine Lösung von 408 mg Hydro-manumycin (43a) in 80 ml 1.4 N methanol. HCl hielt man 4 h bei 75°C im Bombenrohr, brachte das Reaktionsgemisch i. Vak. zur Trockne und trocknete den Rückstand über KOH. Ausb. 414 mg (teils gelb ölige, teils gelbbraune, feste Substanz). Das Gemisch war nur zum Teil in Chloroform löslich. Der braungelbe Rückstand (101 mg) war nach 4 d zu schwarzen, unlöslichen Produkten zersetzt und wurde nicht weiter untersucht.

Der in Chloroform lösliche Teil wurde an 200 g Kieselgel (Säulendurchmesser 3.5 cm) mit Chloroform aufgetrennt. Man erhielt aus der Hauptzone 211 mg (61%) einer farblosen öligen Substanz

(C_{26}-Methylester 43b). Daneben wurden durch Absorption bei 254 nm 10 weitere schneller und langsamer wandernde Zonen (zusammen 104 mg) nachgewiesen, von denen keine mehr als 25 mg ausmachte und die daher verworfen wurden.

$C_{27}H_{45}NO_4$ (447,65) Ber. 447.3348 Gef. 447.3344 (Hochauflösung)

IR: 3279 cm^{-1} (OH, NH); 1739, 1653, 1600 cm^{-1} (CO, C=C)

UV (vgl. Abb. 13): λ_{max} (Methanol) = 289 nm (ϵ = 5100), 252 (sh), 243 (8150)

λ_{max} (Methanol/2 Tropfen 2 N NaOH) = 314 nm (ϵ = 6500), 261 (sh), 254 (9000), 222 (19200)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ = 0.85 (9 H, komplexes Signal), 1-2 (23 H, nicht aufgelöste Signalgruppen), um 2.35 (4 H, m), 2.62 (1 H, m, nicht aufgelöst), 3.65 (Methoxyl), 6.83 (2 H, s, breit), 7.13 (1 H, s, breit), 8.51 (NH), 9.03 (OH)

MS: Abb. 12 und 14

Methanolyse von C_{26}-Methylester 43b

6 mg Methylester 43b wurden mit 2 ml 1.4 N methanol. HCl 24 h im Bombenrohr bei 90°C gehalten. Nach eindampfen der Lösung und Trocknen i. Vak. über KOH wurde 43b laut DC unverändert zurückerhalten (5.8 mg).

2-Actamino-3-hydroxy-2-cyclopenten-1-on (6b) aus Manumycin

Eine Lösung von 493 mg Manumycin in 8 ml Acetanhydrid hielt man 5 h bei 150°C im Bombenrohr. Die rote Lösung wurde i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit siedendem Methanol extrahiert. Das Ungelöste wurde verworfen. Die Methanollösung versetzte man mit dem doppelten Volumen Wasser, filtrierte den ausgefallenen Niederschlag ab, engte auf ca. ein Drittel des Volumens ein und filtrierte erneut. Die Niederschläge wurden verworfen. Das Filtrat verdampfte man i. Vak, zur Trockne und chromatographierte den Rückstand an 50 g Kieselgel (Säulendurchmesser 1. 8 cm) mit Chloroform/2% Methanol. Das aus der Hauptzone (nachgewiesen durch Absorption bei 254 nm) eluierte 6b kristallisierte aus Cyclohexan in farblosen Nadeln.

Schmp. (nach Trocknen im Hochvak. bei 60°C) 166. 5 – 167. 5°C (Lit.[16] 166-168°C).

Ausb. 44. 5 mg (32%).

Zur Analyse wurde bei 120°C i. Hochvak. sublimiert.

$C_7H_9NO_3$ (155. 15)	Ber.	C 54. 19	H 5. 85	N 9. 03
	Gef.	C 54. 36	H 5. 88	N 8. 94

Mol. -Masse 155 (aus dem Massenspektrum)

IR : 3247 cm^{-1} (OH, NH), 1689, 1602, 1544 (CO, C=C)

UV : λ_{max} (Methanol) = 257 nm (ϵ = 14200)

λ_{max} (Methanol/3 Tropfen 2 N NaOH) = 259 nm (ϵ = 23800)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : δ = 2. 20 (N-Acetyl), 2. 51 (schwache AA'BB'-Aufspaltung, $-CH_2-CH_2$), 8. 15 (breit, NH), 13. 20 (s, 3-OH, cheliert)

MS : m/e 155 (M^+, 38%), 113 (M-CH_2CO, 100%), 96 (5%), 85 (9%)

Oxidation von Hydro-manumycin (43a)

a) In Reihenversuchen versetzte man je 5 mg Hydro-manumycin (43a) bei 60-130°C mit 1-3 ml konz. HNO_3. Nach 1-5 min wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Nach Trocknen der Ätherlösung engte man ein, versetzte mit äther. Diazomethanlösung und verdampfte das Lösungsmittel i. Vak.. Der Rückstand wurde im Gaschromatographen untersucht (6m BDA-Säule, 150°C, Bedingungen unter Allgemeines). Keines der Reaktionsgemische zeigte diskrete, auswertbare Peaks.

b) 1.35 g Hydrierungsprodukt (aus 1.6 g Manumycin) löste man in 500 ml Eisessig und gab in 7 gleichen Portionen eine Lösung von 6.275 g Chromsäure (22.5 Mol pro Mol Hydro-manumycin) in 500 ml Eisessig dazu (alle 30 min). Nach 3.5 h wurde zur Reduktion überschüssiger Chromsäure SO_2 eingeleitet, bis die Lösung rein grün war. Man engte i. Vak. auf 150 ml ein, verdünnte unter Eiskühlung mit 2 N NaOH bis zur alkalischen Reaktion (pH = 10) und extrahierte die Lösung dann dreimal mit je 150 ml Äther, wusch die organ. Phase mit Wasser neutral, trocknete über Natriumsulfat und brachte im Vak. zur Trockne.
Ausb. 216 mg blaßgelbes Öl (Neutralstoffe)

Die Wasserphase säuerte man mit 2 N HCl an (pH = 1) und extrahierte wie oben mit Äther. Die gewaschene und getrocknete Ätherlösung wurde eingeengt, mit äther. Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt und eingedampft.
Ausb. 340 mg gelbliches Öl (Methylestergemisch).

Das Methylestergemisch untersuchte man bei 145°C im Gaschromatographen (6 m BDA-Säule, Bedingungen unter Allgemeines). Im Gaschromatogramm (Abb. 16) erkennt man die Peaks A-E und I-IV.

Tab. 8 gibt die Retentionszeiten und C-Atomzahl der Komponenten.

Tab. 8 : Retentionszeiten im Vergleich zur C-Atomzahl der Abbausäuremethylester (vgl. Abb. 16 und 18)

Peak im GC	C-Atomzahl	Zuordnung (n)	Retentionszeit (min x 0.2)	$lg\ t_{dr}$
E	4	10c (2)	2.05	0.312
D	5	(3)	3.02	0.48
C	6	(4)	4.65	0.667
B	7	10b (5)	6.95	0.842
A	8	10a (6)	10.70	1.029
IV	13	9	3.15	0.498
III	13	9	3.30	0.518
II	13	9	3.42	0.534
I	13	9	3.60	0.556

Authent. Korksäure-dimethylester (Octandisäure-dimethylester) gibt im GC unter gleichen Bedingungen eine Retentionszeit wie Komponente A. Gibt man den Vergleichsester zum Methylestergemisch so bleibt Peak A scharf, lediglich seine Intensität erhöht sich.

Massenspektren der Methylester

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit der GC-MS-Kombination bei 130°C isotherm (3m BDA-Säule). Tab. 9 gibt die massenspektroskopischen Daten von Korksäure- und Pimelinsäure-dimethylester (10a und 10b) wieder.

Die Massenspektren der Komponenten I-IV sind identisch (Abb. 17, Tab. 2). Es liegt 2,4,6-Trimethyl-decansäure-methylester (9)

zugrunde.

$C_{14}H_{28}O_2$ Mol.-Masse 228 (aus dem Massenspektrum), Retentionszeiten im GC s. Tab. 8

Tab. 9 : Massenspektren von Korksäuredimethylester (10a) und Pimelinsäuredimethylester (10b)

	10a ($C_{10}H_{18}O_4$) m/e	10b ($C_9H_{16}O_4$) m/e
M^+	fehlt	fehlt
M - 31 ($-OCH_3$)	171 (71%)	157 (36%)
M - 60 ($-HCOOCH_3$)	142 (15%)	128 (31%)
M - 63 ($-OCH_3$, $-CH_3OH$)	139 (18%)	125 (27%)
M - 64 ($-2\ CH_3OH$)	138 (80%)	124 (16%)
M - 73 ($-CH_2-COOCH_3$)	129 (100%)	115 (79%)
M - 91 ($-COOCH_3$, $-CH_3OH$)	111 (26%)	97 (27%)
M - 92 ($-HCOOCH_3$, $-CH_3OH$)	110 (20%)	96 (9%)
$(CH_2)_3-COOCH_3$	101 (11%)	101 (10%)
M - 105 (-74, $-CH_3OH$)	97 (63%)	83 (35%)
$(CH_2)_2-COOCH_3$ (ß,γ-Spaltung)	87 (40%)	87 (25%)
$H_2C=COH-OCH_3$ (McLafferty-Umlag.)	74 (95%)	74 (81%)

2, 4, 6-Trimethyl-decansäureamid (11)

Die nach Ausäthern der alkalischen Oxidationslösung (Chromsäure-Oxidation des Hydro-manumycins) erhaltenen Neutralstoffe (blaßgelbes Öl) gaben im Gaschromatogramm (6 m BDA-Säule, 190°C isotherm) nur 4 Peaks (Retentionszeiten : 56. 9, 58. 95,

61.65 und 65.1 min, Korksäure-dimethylester : 17.0 min).

Zur weiteren Reinigung wurden 100 mg des öligen Gemisches an 50 g Kieselgel (Säulendurchmesser 1.8 cm) mit Chloroform chromatographiert (Prüfung der Fraktionen im GC, die einzelnen Komponenten waren in einzelnen Fraktionen angereichert). Aus der langgezogenen Hauptzone wurden 86 mg 11 (34% Gesamtausbeute bezogen auf eingesetztes Manumycin-Hydrierungsgemisch) isoliert. Farblose, wachsartige Substanz.

$C_{13}H_{27}NO$ Ber. 213.2093 Gef. 213.2088 (Hochauflösung)

IR : 3322, 3155 cm^{-1} (NH), 1650, 1631 (sh) cm^{-1} (CO)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : Abb. 20

MS : a) Die im GC getrennten Substanzen I-IV geben identische Spektren (GC-MS-Kombination, 170°C isotherm).

b) Diastereomerengemisch in Atlas CH 4 s. Abb. 19

Methanolyse von 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid (11)

51 mg 11 wurden in 12 ml 1.4N methanol. HCl gelöst und im Bombenrohr 4 h bei 105°C gehalten. Nach Verdampfen des Lösungsmittels verblieb ein öliger Rückstand (über KOH getrocknet). Ausb. 48 mg (90%) 2,4,6-Trimethyl-decansäuremethylester (9).

9 wurde durch Vergleich der Retentionszeiten im analytischen Gaschromatogramm (145°C isotherm) und der Massenspektren (GC-MS-Kombination, 130°C, isotherm) mit oben beschriebenem 9 identifiziert.

Chromsäure-Oxidation des Manumycins

Eine Lösung von 736 mg Manumycin (38) in 21 ml 90 proz. Essigsäure verteilte man auf 7 Kolben und gab in jeden nach 0. 1, 2. 4 und 5 h jeweils 0. 6 ml einer Lösung von 720 mg feuchter Chromsäure in 21 ml 60 proz. Essigsäure (fünffacher molarer Überschuß). Nach 6 h wurden die Oxidationslösungen vereinigt, mit 2 N HCl auf 250 ml verdünnt und 5 mal mit je 200 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft.

Ausb. 377 mg gelbbraunes Öl (nach Trocknen über KOH).

Das Oxidationsprodukt wurde an 350 g Kieselgel (Säulendurchmesser 4. 7 cm) mit Chloroform/2% Methanol chromatographiert. Nacheinander wurden folgende Fraktionen eluiert und aufgefangen :

1) 134 mg blaßgelbes Öl, das laut DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9 : 1) einheitlich war (Zone 1).

2) 70 mg gelbes Öl, aus dem durch nochmalige Chromatographie an Kieselgel (70 g, Säulendurchmesser 1. 8 cm, Chloroform) weitere 20 mg des Inhaltsstoffes der Zone 1, je 5 mg der Zonen 2 und 3 und 40 mg unverändertes Manumycin (Zone 4) isoliert werden.

3) 21 mg gelbbraunes Öl, das laut DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9 : 1) mit einer Substanz identisch ist, die auch beim Stehenlassen von Manumycin in Lösung als Zersetzungsprodukt entsteht (im DC einheitlich, Zone 5).

4) mit Methanol wurden 69 mg braunes, öliges Substanzgemisch eluiert.

Das aus Zone 1 eluierte 2-(2, 4, 6-Trimethyl-2, 4-decadienoyl)amino-5, 6-epoxy-1, 4-benzochinon (30) wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels als blaßgelbes Öl erhalten und war chromatographisch einheitlich (R_F-Werte s. Tab. 10).

Ausb. 154 mg (38% bezogen auf umgesetztes Manumycin).

$[\alpha]_D^{20} = -8.1^o$ (c = 1.0 in Chloroform)

IR (vgl. Abb. 22): 3401, 3344 cm^{-1} (NH), 1684 (sh), 1675, 1608 cm^{-1} (CO, C=C)

UV (vgl. Abb. 33): λ_{max} (Methanol) = 320 nm (ϵ = 11400), 245 (10600)

λ_{max} (Methanol/1 Tropfen 2 N HCl) = 317 nm (ϵ = 9900), breites Maximum zwischen 260 und 210 (10000)

λ_{max} (Methanol/1 Tropfen 2 N NaOH) = 308 nm (ϵ = 17200), 230 (9600)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Abb. 23 und Tab. 5, Doppelresonanzversuche Tab. 3

(C_6D_6) : δ = 0.88 (t, 10'-H_3), 0.89 (d, 13'-H_3), 1.20 (s, breit, 7'-H_2, 8'-H_2, 9'-H_2), 1.58 (d, J = 1 Hz, 12'-H_3), 1.81 (d, J = 1 Hz, 11'-H_3), 2.30 (m, nicht aufgelöst, 6'-H), 3.15 (d, J_{AB} = 4 Hz, 6-H), 3.21 (dd, J_{AB} = 4 Hz, J_{AX} = 2 Hz, 5-H), 5.22 (d, breit J = 10 Hz, 5'-H), 6.76 (s, breit, 3'-H), 7.73 (d, J_{AX} = 2 Hz, 3-H), 7.98 (s, breit, NH)

^{13}C-NMR (Bruker Gerät, 260 mg in $CHCl_3$) : Abb. 21 und Tab. 5

$C_{19}H_{25}NO_4$ Ber. 331.1783 Gef. 331.1779 (Hochauflösung)

MS: Abb. 24; durch Hochauflösung gesichert sind weiter folgende Ionen :

m/e	Ber.	Gef.	Summenformel
274	274.1079	274.1082	$C_{15}H_{16}NO_4$
246	246.0766	246.0764	$C_{13}H_{12}NO_4$
233	233.0688	233.0684	$C_{12}H_{11}NO_4$
193	193.1592	193.1591	$C_{13}H_{21}O$

Hydrierung des C_{19}-Abbauprodukts 30

50 mg 30 wurden zu einer Suspension von 107 mg vorhydriertem Katalysator in 25 ml Methanol gegeben und bis zur Beendigung der Wasserstoffaufnahme hydriert (10 min, H_2-Aufnahme 11.8 ml unter Normalbedingungen entsprechend 3.5 Mol.-Äquivalenten). Die Hydrierungslösung wurde filtriert und eingedampft.
Ausb. 42 mg (rotes Öl).
Das Hydrierungsgemisch chromatographierte man an Kieselgel (50 g, Säulendurchmesser 1.8 cm) mit Chloroform, es bildeten sich drei Zonen (von unten gezählt): 1) gelb, 2) gelb, wenig Substanz verworfen, 3) rot, am Kopf der Säule. Nachdem die ersten beiden Zonen eluiert waren, wurde der Inhaltsstoff aus Zone 3 mit Chloroform/Methanol 2:1 ausgewaschen.

2-(2,4,6-Trimethyl-decanoyl)amino-1,4-benzochinon (21)

Das aus Zone 1 eluierte 21 wurde als gelbes Öl erhalten und war dann chromatographisch einheitlich (R_F-Werte s. Tab. 10).
Ausb. 6 mg (12%)
IR (vgl. Abb. 26): 3356 cm^{-1} (NH), 1672, 1653 cm^{-1} (CO), 1600 cm^{-1} (C=C), 1504, 892, 834 cm^{-1}

UV (vgl. Abb. 27) : λ_{max} (Methanol) = 380 nm (ϵ = 950), 256 (5100), 224 (7100)

λ_{max} (Methanol/1 Tropfen 2 N NaOH) = 294 nm (ϵ = 6900) 224 (sh)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, vgl. Abb. 28) : δ = 0-2 (Signale für 24 Protonen, nicht aufgelöst), 2.50 (m, nicht aufgelöst, 2'-H), 6.75 (Kopplung nicht aufgelöst, 2 H), 7.61 (Kopplung nicht aufgelöst, 1 H), 8.01 (s, breit, NH)

$C_{19}H_{29}NO_3$ Ber. 319.2147 Gef. 319.2140 (Hochauflösung)

MS: Abb. 25 ; durch Hochauflösung sind außerdem folgende Ionen gesichert :

m/e	Ber.	Gef.	Summenformel
197	197.1905	197.1902	$C_{13}H_{25}O$
179	179.0582	179.0578	$C_9H_9NO_3$
125	125.0476	125.0469	$C_6H_7NO_2$
109	109.0527	109.0529	C_6H_7NO

2-(2,4,6-Trimethyl-decanoyl)amino-5-hydroxy-1,4-benzochinon (25b)

Die aus Zone 3 eluierte gelbrote Substanz (35 mg) ließ sich an Oxalsäure-Kieselgel (10 g, Säulendurchmesser 1.5 cm) mit Chloroform weiter reinigen. Die gelbe Hauptzone enthielt gelbrotes 25b . Ausb. 33 mg (65%) .

R_F-Wert (Oxals.-Kieselgel, Chloroform) = 0.22

IR : 3279 cm^{-1} (OH, NH), 1709, 1645, 1608 cm^{-1} (CO, C=C)

UV : λ_{max} (Methanol) = 480 nm (ϵ = 850), 311 (13300), 231 (12900)

λ_{max} (Methanol / 1 Tropfen 2 N HCl) = 410 nm (ϵ = 850), 297 (14100), 288 (sh), 223 (sh)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : δ = 0-3 (25 H, nicht aufgelöst, aliphatische Kette), 6.05 (s, 6-H), 7.55 (s, 3-H), 8.42 (s, breit, NH)

$C_{19}H_{29}NO_4$ Ber. 335.2096 Gef. 335.2088 (Hochauflösung)

MS : 335 (30%, M^+), 197 (7%, M-$C_6H_4NO_3$), 195 (23%, M-$C_{10}H_{20}$), 179 (17%), 141 (61%, M-$C_{13}H_{24}O$ + 2 H), 140 (10%, $C_{10}H_{20}$), 139 (11%, M-$C_{13}H_{24}O$), 123 (6%, C_9H_{15}), 109 (19%)

2-(2,4,6-Trimethyl-decanoyl)amino-5-methoxy-1,4-benzochinon (25a)

Eine Lösung von 30 mg 25b in 1 ml Äther versetzte man tropfenweise mit äther. Diazomethanlösung, bis ein auf neutrales Kieselgel getüpfelter Fleck rein gelb (ohne Rotstich) war. Der Verdampfungsrückstand wurde an 10 g Kieselgel (Säulendurchmesser 1.5 cm) mit Chloroform chromatographiert. Aus der gelben Hauptzone eluierte man 25a, das als gelbes Öl anfiel.

Ausb. 28 mg (90%)

IR (vgl. Abb. 30) : 3344 cm^{-1} (NH), 1672 (sh), 1667, 1653 (sh), 1605 (CO, C=C)

UV (vgl. Abb. 27) : λ_{max} (Methanol) = 400 nm (ϵ = 1000), 293 (22300), 220 (15000)

λ_{max} (Methanol / 1 Tropfen 2 N NaOH) = 420 nm (ϵ = 1000), 293 (22300), 220 (15000)

^{1}H-NMR($CDCl_3$) : Abb. 29

$C_{20}H_{31}NO_4$ Ber. 349.2253 Gef. 349.2255 (Hochauflösung)

MS: Abb. 31 ; folgende Ionen des Massenspektrums wurden durch Hochauflösung zugeordnet :

m/e	Ber.	Gef.	Summenformel
209	209.0679	209.0688	$C_{10}H_{11}NO_4$
179	179.1799	179.1796	$C_{13}H_{23}$
155	155.0582	155.0583	$C_7H_9NO_3$
154	154.0504	154.0503	$C_7H_8NO_3$
153	153.0425	153.0429	$C_7H_7NO_3$

Methanolyse von 25a

5 mg 25a wurden mit 1 ml 1.4 N methanol. HCl 4 h im Bombenrohr bei 105°C gehalten. Im Verdampfungsrückstand ließen sich im GC 4 Methylester I-IV nachweisen, die in der Retentionszeit mit den beschriebenen 9 (Diastereomere I-IV, Abb. 16) identisch waren.

1,4-Diacetoxy-2-(2,4,6-trimethyl-decanoyl)amino-5-methoxy-benzol (26)

Zu einer Lösung von 80 mg 25a in 50 ml Acetanhydrid gab man 2 g wasserfreies Natriumacetat, erhitzte auf 60°C und fügte portionsweise 150 mg Zinkstaub dazu (doppelte molare Menge). Dabei verfärbte sich die Lösung von gelb nach grün und wurde dann farblos. Nach 14 h ließ man abkühlen, filtrierte und brachte das Filtrat i. Vak.

zur Trockne. Den Rückstand chromatographierte man an 30 g Kieselgel (Säulendurchmesser 1.8 cm) mit Chloroform. Die farblose Hauptzone (angezeigt durch Absorption bei 254 nm) lieferte 56 mg (56%) 26. Die aus anderen (langsameren) Zonen isolierten Substanzen wurden nicht untersucht.

IR: 3195 cm^{-1} (NH), 1767, 1757, 1667 cm^{-1} (CO)

UV (vgl. Abb. 27): λ_{max} (Methanol) = 281 nm (ϵ = 3200), 233 (9300)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, vgl. Abb. 32): δ = 0-2 (24 H, nicht aufgelöste Signale der aliphatischen Kette), 2.28 (s, Acetyl), 2.32 (s, Acetyl), darunter Signal von 2'-H, 6.77 (s, 6-H), 7.03 (breit, NH), 7.81 (s, breit, 3-H)

$C_{24}H_{37}NO_6$ (435.57) Mol.-Masse aus dem Massenspektrum

MS: m/e 435 (M^+, 27%), 393 (M - 42, 9%), 375 (12%, M - 60), 351 (20%, M - 42 - 42), 333 (25%, M - 60 - 42), 295 (23%, M - $C_{10}H_{20}$), 281 (53%), 249 (73%), 197 (100%, $C_{13}H_{25}O$), 155 (100%, M - 197 - 42 - 42)

Das Massenspektrum zeigt noch einen Peak bei m/e 477 (6%), der auf ein Triacetat (Acetylierung am NH in 26) hindeutet. Ob dieses Ion eine leichter flüchtige Verunreinigung anzeigt oder durch intermolekulare Acetylierung im Massenspektrometer entsteht, ist ungeklärt.

Reduktion von Manumycin (38) mit Natriumborhydrid

Zu einer Lösung von 220 mg Manumycin (38) in 50 ml Methanol gab man in 7 Portionen 61 mg $NaBH_4$ (alle 2 min), verdünnte mit

Wasser, brachte mit 0.5 N Oxalsäure auf pH = 3 und extrahierte die Lösung dreimal mit je 100 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet, unter Zusatz von etwas Methanol filtriert und eingedampft.

Ausb. 225 mg gelbrote Festsubstanz.

Das Reaktionsgemisch chromatographierte man an 110 g Sephadex LH 20 (Säulendurchmesser 2.5 cm) mit Chloroform. Es bildeten sich 7 Zonen : 1), 2) und 3) gelb, verworfen, 4) gelbbraun, verworfen, 5) rot, verworfen, 6) gelbrot, 7) gelbrot. Aus Zone 6 wurden 29 mg gelbrote Festsubstanz eluiert, die nicht weiter untersucht wurde. Aus Zone 7 (Hauptzone) wurden 173 mg (78%) Dihydro-manumycin (36) eluiert, das laut DC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) mit einer Spur einer weiteren gelben Substanz verunreinigt war.

Schmp. sintert ab 117°C, Zersetzung bei 130°C

IR : 3367, 3279 cm^{-1} (OH, NH), 1678 (sh), 1660 (sh), 1641 (sh), 1616, 1600 cm^{-1} (CO, C=C), 1005 cm^{-1}

UV: λ_{max} (Methanol)= 301 nm (ϵ = 51700), 263 (ϵ = 48900)

λ_{max} (Methanol/2 Tropfen 2 N HCl) = 378 nm (ϵ = 51700), 270 (26500)

^{1}H-NMR ($CDCl_3/CD_3OD$) : δ = 0.86 (t, 10'-H_3), 0.95 (d, 6'-H_3), 1.25 (s, breit, 7'-H_2, 8'-H_2, 9'-H_2), 1.79 (s, 12'-H_3), 2.00 (s, 11'-H_3), 2.54 (s, breit, 6'-H und 4"-H_2, 5"-H_2), 2.83 (HOD), 3.36 (dd, J_{AB} = 4.4 Hz, J_{AX} = 2.5 Hz, 5-H), 3.61 (dd, J_{AB} = 4.4 Hz, J_{BY} = 2.5 Hz, 6-H), 4.44 (d, nicht aufgelöst, J_{BY} = 2.5 Hz, 1-H), 5.28 (d, breit, J = 10 Hz, 5'-H), 5.5-7.5 (nicht aufgelöste Signalgruppen für 8 H), 7.92 (2-NH), 8.40 (2"-NH)

(vgl. Abb. 33)

^{1}H-Doppelresonanz : Tab. 6

Darstellung von 2-Acetamino-1,4-benzochinon (22) [27]

Man löst 1.52 g 2-Acetaminophenol (Aldrich, Belgien) in 100 ml Aceton und gibt unter Rühren eine Lösung von 6 g Fremy-Salz (Kalium-nitroso-disulfonat) in 300 ml 0.067 M Phosphatpuffer (pH = 6) dazu. Es erfolgte ein Farbumschlag nach Dunkelrot. Nach 15 min wird viermal mit je 100 ml Chloroform extrahiert, die vereinigten Chloroformextrakte werden getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an 100 g Kieselgel (Säulendurchmesser 3.5 cm) mit Chloroform unter Druck chromatographiert. Aus der gelben Hauptzone eluierte man 1.16 g gelbes 22 vom Schmp. 140-142°C (Lit.[27] : 142°C).

IR : 3205 cm^{-1} (NH), 1667, 1595 cm^{-1} (CO, C=C)

UV: λ_{max} (Methanol) = 379 nm (ϵ = 2000), 257 (11800), 226 (14300)

λ_{max} (Methanol/3 Tropfen 2 N NaOH) = 474 nm (ϵ = 870) 292 (11300)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : δ = 2.23 (s, N-Acetyl), 6.74 (5-H, 6-H, schwach strukturiert), 7.55 (3-H, schwach strukturiert), 8.06 (NH)

Darstellung von 2-Acetamino-5,6-epoxy-1,4-benzochinon (29b) [28]

780 mg 22 in 360 ml Äthanol wurden mit einer Lösung von 2.25 g Natriumperborat ($NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3\,H_2O$) in 240 ml Wasser versetzt und nach 2 min mit 2 N HCl auf pH = 5 angesäuert. Die Reaktionslösung extrahierte man viermal mit je 100 ml Chloroform, trocknete die vereinigten Extrakte über Natriumsulfat und dampfte ein. Den

Rückstand chromatographierte man an 60 g Kieselgel (Säulendurchmesser 2.2 cm) mit Chloroform unter Druck. Aus der gelben Hauptzone wurden 130 mg eines Gemisches aus 22 und 29b eluiert, das an 60 g Kieselgel ohne Druck (sonst wie oben) nochmals chromatographiert wurde. Das aus der Hauptzone (angezeigt durch Absorption bei 254 nm) eluierte 29b (88 mg) wurde bei 100°C i. Hochvak. sublimiert.

Ausb. 81 mg (9.5%). Schmp. 166-167°C (Zersetzung, Braunfärbung)

IR: 3279 cm^{-1} (NH), 1695 cm^{-1} (CO), 1609 cm^{-1} (C=C), 1006 cm^{-1}

UV: λ_{max} (Methanol) = 311 nm (ϵ = 6950), 219 (7950)

λ_{max} (Methanol/3 Tropfen 2 N NaOH) = 295 nm (ϵ = 11300)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Tab. 4

Biologische Aktivität: Tab. 10

$C_8H_7NO_4$ (181.15)	Ber.	C 53.04	H 3.90	N 7.73
	Gef.	C 53.10	H 3.97	N 7.60

Tab. 10: Biologische Aktivität von 29b. Hemmhofdurchmesser (mm) im Plattendiffusionstest gegen B. subtilis und E. coli (9 mm Filterrondelle)

c (µg/ml) / Testorganismus	1000	315	100	31.5	10
E. coli (Sy)	49	40	23	15	-
E. coli (KO)	25	20	12	-	-
B. subt. (Sy)	44	29	19	-	-
B. subt. (KO)	29	22	16	-	-

Sy = definierter Nährboden, KO = Komplett-Nährboden

Tab. 11 : Biologische Aktivität und R_F-Werte [x)] der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen

Substanz	Hemmhofdurchmesser (c = 1 mg/ml) E. coli (Sy)	Hemmhofdurchmesser (c = 1 mg/ml) B. subt. (Sy)	R_F-Werte Chloroform/ 2% Methanol	R_F-Werte Chloroform/ 5% Methanol	R_F-Werte Chloroform/ 10% Methanol
Manumycin (38)	-	48	0,16	0,42	0,55
Hydro-M. (43a)	-	12	0,31	0,52	0,61
43b	-	-	0,57	0,67	0,71
6b	-	-	0,10	0,15	0,22
30	-	29	0,67	0,70	0,72
21	-	14	0,65	0,70	0,74
25b	-	16	0,04	0,09	0,20
25a	-	-	0,63	0,69	0,74
26	-	-	0,56	0,64	0,69
22	26	37	0,43	0,53	0,58
29b	49	44	0,37	0,45	0,51
36	-	-	0,06	0,20	0,44

Literaturverzeichnis

1) H. Zähner und W. K. Mass, Biology of Antibiotics, Springer-Verlag, Berlin -Heidelberg-New York 1972

2) T. J. Franklin und G. A. Snow, Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1973

3) E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond und M. J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, J. Wiley-Verlag, London 1972

4) D. Gottlieb und P. D. Shaw (ed.), Antibiotics Vol. 1 : Mechanism of Action, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967

5) H. Umezawa (ed.), Index of Antibiotics from Actinomycetes, University of Tokyo Press, Tokyo 1967

6) T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer und W. Kurylowicz, Antibiotics, Vol. 1 und 2, Pergamon Press, Oxford 1967

7) F. Buzetti, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neip, V. Prelog und H. Zähner, Pharmaceutica Acta Helvetiae 38, 871 (1963)

8) H. H. Wassermann, G. C. Roger, jr. und D. D. Keith, J. C. S. Chem. Commun. 1966, 825

9) U. Fickenscher, W. Keller-Schierlein und H. Zähner, Arch. Microbiol. 75, 346 (1971)

10) J. T. Clerc, E. Pretsch und S. Sternhell, ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1973

11) K. Schabacher, Dissertation, Universität Göttingen 1973

12) R. Muntwyler und W. Keller-Schierlein, Helv. Chim. Acta 55, 2071 (1972)

13) J. E. Stothers und P. G. Lauterbur, Can. J. Chem. 42, 563 (1964)

14) K. Frobel, Diplomarbeit, Universität Göttingen 1974

15) R. Tschesche, D. Lenoir und H. L. Weidenmüller, Tetrahedron Lett. 1969, 141

16) P. Welzel, H. Buhlke, J. Simons, L. Winterfeld, R. Tschesche, H.-W. Fehlhaber und G. Huber, Tetrahedron Lett. 1973, 227

17) H. Brockmann, H.-U. May, W. Lenk und H. Brockmann jr., Chem. Ber. 102, 3217 (1969)

18) H. Günther, Angew. Chem. 84, 907 (1972)

19) R. Tschesche, J. Blumbach und P. Welzel, Liebigs Ann. Chem. 1973, 407

20) Eight Peak Index of Mass Spectra, Aldermaston, Reading 1970

21) Varian, High Resolution NMR Spectra Catalog 1963 no. 142

22) H. Günther, NMR-Spektroskopie, Thieme-Verlag, Stuttgart 1973

23) G. Odham und E. Stenhagen, in Biochemical Applications in Mass Spectrometry, Wiley Interscience, New York 1972

24) S. J. D. Mari, J. Am. Chem. Soc. 88, 1226 (1966)

25) R. H. Thomson, Naturally occuring Quinones 2. Aufl., Acad. Press, London 1971

26) W. Flaig, J. C. Salfeld und U. E. Baume, Liebigs Ann. Chem. 618, 117 (1958)

27) H. J. Teuber und O. Glosauer, Chem. Ber. 98, 2939 (1965)

28) A. Rashid und G. Read, J. Chem. Soc. C 1967, 1323

29) R. K. Norris und S. Sternhell, Austr. J. Chem. 19, 617 (1966)

30) K. Sasaki, K. L. Rinehart jr., G. Stomp, M. F. Grostic und E. C. Olson, J. Am. Chem. Soc. 92, 7591 (1970)

31) Z. Kis, A. Closse, H. P. Sigg, L. Hruban und G. Snatzke, Helv. Chim. Acta 53, 1577 (1970)

32) K. Tori, T. Komeno und T. Nakagawa, J. Org. Chem. 29, 1136 (1964)

33) J. Meinwald und Y. C. Meinwald, J. Am. Chem. Soc. 85, 2541 (1963)

34) S. K. Balasubramanian, D. H. R. Barton und L. M. Jackman, J. Chem. Soc. 1962, 4816

35) R. Craveri und G. Giolitti, Nature, 179, 1307 (1957)

36) L. Canonica, A. Corbella, G. Jommi, F. Pellizoni und C. Scolastico, Tetrahedron Lett. 26, 3031 (1966)

37) S. Tagahashi, A. Okanishi, R. Utahara, K. Nitta, K. Maeda und H. Umezawa, J. Antibiotics 23, 48 (1970)

38) F. L. Weisenborn, J. L. Bouchard, D. Smith, F. Pansy, G. Maestrone, G. Miraglia und E. Meyers, Nature 213, 1092 (1967)

39) W. A. Slusarchyk, J. L. Ewing und F. L. Weisenborn, J. Antibiotics 26, 391 (1973)

40) S. Tageuchi und H. Jonehara, J. Antibiotics 14, 44 (1961)

41) C. Vos und P. E. Verwiel, Tetrahedron Lett. 1973 , 5173

42) H. Maehr, M. Leach, L. Yarmchuk und A. Stempel , J. Am. Chem. Soc. 95, 8449 (1973)

43) B. Wittkopp, Experientia 27, 1121 (1971)

44) D. B. Borders, P. Shu und J. E. Lancaster, J. Am. Chem. Soc. 94, 2540 (1972)

45) M. W. Miller Tetrahedron 24, 4839 (1968)

46) F. A. MacKellar, M. F. Grostic, E. Colson, R. J. Wnuk, A. R. Branfman und K. L. Rinehart jr., J. Am. chem. Soc. 93, 4943 (1971)

47) K. L. Rinehart jr., J. R. Beck, D. B. Borders, T. H. Knistle und D. Krauss, J. Am. Chem. Soc. 85, 4038 (1963)

48) W. Keller-Schierlein, Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe 30, 314 (1973)

49) S. Omura, M. Katagiri, A. Nakagawo, Y. Samo, S, Nomura und T. Hata, J. Antibiotics 20, 349 (1967)

50) B. G. Christensen, W. J. Leanza , T, R. Beatie, A. A. Patchett, B. W. Arison, R. E. Ormond , F. W. Kuehl, G. A. Schönberg, und O. Jardetzky, Science 166, 123 (1969)

51) V. Prelog und W. Oppolzer, Helv. Chim. Acta 56, 2279 (1973)

Ich danke Herrn Dr. G. Remberg und Herrn H. Kohl für die Aufnahme der Massenspektren, Frau E. Salkowski für die Aufnahme der ^{1}H-NMR Spektren, Frau Dr. I. Field (TU Braunschweig) sowie Herrn Dr. P. Christiansen und Herrn D. M. Wilson (Berkeley) für die Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren, Frau G. Bonneberg und Fräulein H. Thomas für Aufnahme von IR- und UV-Spektren sowie experimentelle Mitarbeit, Herrn M. Beller für die Durchführung der Microanalysen, Frau E. v. Throta und Frau M. Lackner für microbiologische Arbeiten und Herrn S. Uhl und Herrn E. Adami für Betreuung und Aufarbeitung der Submersansätze.

Meine Akademischen Lehrer waren :

Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann, Prof. Dr. W. A. Bingel, Prof. Dr. O. Glemser, Prof. Dr. R. Hilsch, Prof. Dr. W. Joost, Prof. Dr. W. Lüttke, Prof. Dr. N. Pfennig, Prof. Dr. H. G. Schlegel, Prof. Dr. U. Schöllkopf, Prof. Dr. G. Spiteller, Prof. Dr. H. G. Wagner und Prof. Dr. M. Ziegler.

Lebenslauf

Am 18. November 1944 wurde ich , Karsten Schröder, als zweiter Sohn des Prof. Dr. jur. Horst Schröder und seiner Ehefrau Dr. Ursula Schröder, geb. Wegener in Graz geboren.

Nach der Flucht im Jahre 1945 lebten wir in Bremen, bis wir 1949 nach Kiel übersiedelten. Dort besuchte ich ab Ostern 1951 die Grundschule. Ab 1955 besuchte ich die Kieler Gelehrtenschule. 1956 zogen wir nach Tübingen, wo ich am Uhland-Gymnasium 1964 das Zeugnis der Reife erwarb.

Nach 18 Monaten Wehrdienst begann ich im Wintersemester 1965/66 in Göttingen das Studium der Chemie. Am 22.10.1969 legte ich die Diplomvorprüfung ab. Danach arbeitete ich unter der Anleitung von Dr. Axel Zeeck in der Abteilung von Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann an meiner Diplomarbeit : "Analyse der Lipide aus Streptomyces parvulus " und bestand am 4.5.1971 die Diplom-Hauptprüfung.

Seither arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Dr. Axel Zeeck an der vorliegenden Dissertation.